

Université de La Réunion
Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé
ED N°542
UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
CIRAD-Université de La Réunion

Habilitation à Diriger des Recherches

Dossier présenté par
Emmanuel WICKER

Mélodie en Sous-Sol Ecologie, évolution et virulences de pathogènes telluriques

Soutenu le 15 Décembre 2015, devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------------|---|------------|
| NEEMA Claire | Professeur, Montpellier SupAgro | Rapporteur |
| JACQUES Marie-Agnès | Directeur de Recherches, INRA, Angers | Rapporteur |
| MOURY Benoît | Directeur de Recherches, INRA, Avignon | Rapporteur |
| BENA Gilles | Directeur de Recherches, IRD, Montpellier | Evaluateur |
| BESSE Pascale | Professeur, Université de La Réunion | Evaluateur |

Remerciements

Cette période intense de rédaction, de réflexion sur mon parcours, m'amène à rendre hommage à ceux et celles qui ont jalonné ou croisé ma route sinueuse. Tout d'abord, je voudrais remercier ceux qui m'ont donné l'envie de m'orienter en recherche : Alain Chalamet, Francis Rouxel, et Xavier Nesme qui avait « repéré l'étincelle » en moi, et que j'ai recroisé bien après les TP de microbiologie de maîtrise... Merci à toi, Francis, pour m'avoir aidé à sauter le pas, de la carrière d'ingénieur prévue initialement vers la thèse de doctorat puis ce parcours de scientifique. Une pensée également pour Philippe Prior, qui m'a « mis le pied à l'étrier » lors de mon entrée dans le petit monde des bactériologistes et m'a soutenu lors de mes premières années au CIRAD et dans mon « retour à la science »... Merci à lui, pour tout ce que nous avons fait ensemble avant mon arrivée au Pôle 3P.

Mon passage en Martinique, parfois difficile mais exaltant, m'a donné l'occasion de monter *ex nihilo* un laboratoire, dont le fonctionnement aurait été impossible sans Régine Coranson-Beaudu, à l'aise sur tous les terrains même enceinte jusqu'aux yeux (!). Sa motivation toujours renouvelée, son allant avec les stagiaires et partenaires, sa volonté d'apprendre ont permis de développer rapidement les différentes activités de notre petite équipe. Merci à toi Régine ! Je n'oublie pas les collègues qui m'ont assisté dans les débuts : Laurence Grassart, Danièle Mian du SPV, Cica Urbino et PYT de Guadeloupe, Tophe Bugaud «the quality man ».

L'arrivée à l'UMR PVBMT m'a permis de me ressourcer scientifiquement, au contact d'excellents chercheurs du lieu et d'ailleurs, et frères humains. Merci à vous Pierre, « Krostif » Lemaire, Virginie, Fred « Dieu de l'R » (et qui n'en manque pas...), Christian, Jacques le grand sourcier du Rwanda, Jean-Mi...

Les travaux présentés ici sont avant tout le fruit des activités de l'équipe Ralstonia-GENETOM, à géométrie variable durant toutes ces années mais à motivation constante ! Merci à Jean-Michel Baptiste et Sylvain Lebon, fidèles fournisseurs de plantes à torturer, et aux nombreuses assistantes de laboratoire passées et malheureusement parties : Magali Turpin, Fanny Maillot, Edith Mamosa, Marie Terville. Et je voudrais rendre un hommage particulier à mes étudiants, à qui j'espère avoir transmis « la flamme », qui m'ont supporté pendant quelques semaines, mois ou années, et dont la plupart ont gardé contact. Une pensée spéciale pour Flora (jeune maman), Carine qui m'a fait découvrir l'Afrique avec Daouda KONE, Pierre... Sylvia et Jérémy, maintenant c'est à vous !

Ces travaux sont aussi le fruit de collaborations tissées au cours des années, pas toujours en conditions favorables ; je leur en suis d'autant plus reconnaissant ! Merci donc à Marie-

Christine Daunay (papesse des Solanacees) de l'INRA Avignon, Alice Guidot de l'INRA Toulouse, Boris Vinatzer de VirginiaTech. J'aurais aimé continuer avec vous ! Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à Claire Neema (qui a assisté à une lointaine soutenance..), Marie-Agnès Jacques, Benoit Moury, Gilles Béna et Pascale Besse pour avoir accepté d'évaluer ce travail et participer à ce jury.

Dans ce mémoire, il y a un projet sur lequel j'ai travaillé avec mes futurs collègues de l'UMR IPME. Merci en particulier à Valérie Verdier pour son soutien dans ce nouveau départ.

Je remercie les collègues passés et présents du 3P et du PRAM, trop nombreux pour être nommés ici, avec qui j'ai eu plaisir à boire le café, rire à midi, brâmer à 18 heures...Une pensée respectueuse et amicale aux disparus, Serge Quilici, Daniel Barreteau, Thierry Goguey. Je pense également aux amis dont le soutien m'a permis de boucler ce parcours, de la Réunion – notamment Claude et Gwen qui m'ont évité la sortie de route en 2010-2011, de la Martinique – Tophe et Corinne que je rejoins à St Mathieu- et d'ailleurs, que je vais enfin revoir plus souvent !

Enfin, toute ma tendresse silencieuse va à ma famille, mes chers parents, et ma tribu émigrée au pied du pic St Loup : mon grand Raphaël descendu de la planète Mars, Romane ma gymnaste préférée, Mathieu au sourire si doux, et Patricia pour son amour et sa patience. Mon ermitage touche à sa fin !

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 1 : Parcours scientifique et professionnel | 1 |
| 1 Curriculum-vitae | 1 |
| 1.1 Cursus universitaire | 1 |
| 1.2 Cursus professionnel | 2 |
| 2 Activités d'enseignement et de formation | 2 |
| 2.1 Formation initiale | 2 |
| 2.2 Formation continue | 2 |
| 2.3 Formation à et par la recherche | 3 |
| 2.3.1 Accueil de doctorants et chercheurs | 3 |
| 2.3.2 Encadrement d'étudiants (DUT, BTS, Master, VSC) | 4 |
| 3 Responsabilités administratives | 7 |
| 4 Animation et administration de la recherche | 8 |
| 4.1 Evaluation de la recherche | 8 |
| 4.2 Projets de recherche | 9 |
| 4.3 Animation de la recherche | 9 |
| 4.4 Réseau de recherche pour montage de projet | 10 |
| 4.5 Contrats de recherche | 10 |
| 4.6 Expertises | 10 |
| 5 Production scientifique | 11 |
| 5.1 Publications dans des revues à comité de lecture | 11 |
| 5.2 Publications sans comité de lecture | 15 |
| 5.3 Communications orales | 16 |
| CHAPITRE 2 : Activités de recherche | 21 |
| 1 Introduction | 21 |
| 2 <i>Aphanomyces euteiches</i> , un parasite émergent surgi du passé | 22 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3 | Le monde de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 28 |
| 4 | Emerging from the wild: l'écotype émergent de Martinique - Facteurs écologiques de l'émergence en Martinique de la lignée IIB/4NPB..... | 34 |
| 4.1 | Les souches « IIB/4NPB » sont monophylétiques, et constituent un écotpe distinct | 35 |
| 4.1.1 | Un spectre de virulence inattendu sur tomate | 35 |
| 4.1.2 | Le groupe « IIB/4NPB » remet en cause la dichotomie Souches « Moko »/souches « Flétrissement bactérien » | 36 |
| 4.2 | Facteurs écologiques de l'émergence..... | 37 |
| 4.3 | Une menace latente pour la Caraïbe et l'Amérique du Sud | 39 |
| 4.3.1 | Epidémiosurveillance Caraïbes..... | 40 |
| 4.3.2 | Emergence en Guyane française..... | 41 |
| 4.4 | D'où vient cet écotpe émergent ? | 42 |
| 5 | Adaptation à l'hôte et durabilité de résistance - « Pathogen-informed strategies for durable resistance » | 45 |
| 5.1 | En quoi la biologie des populations peut-elle informer sur la durabilité de résistance ? | 45 |
| 5.1.1 | Les modèles de co-évolution..... | 46 |
| 5.1.2 | Le système immunitaire des plantes : du zig-zag à l'invasion..... | 48 |
| 5.1.3 | Comment évaluer la durabilité de résistance ?..... | 51 |
| 5.1.4 | Exploiter l'évolution du pathogène pour augmenter la durabilité de résistance de l'hôte | 53 |
| 5.2 | Le contexte : comment les Solanacées résistent (tant bien que mal) à <i>Ralstonia solanacearum</i> | 54 |
| 5.3 | « Le choix des armes » : recherche des facteurs génétiques de virulence sur aubergine et tomate..... | 56 |
| 5.3.1 | Identification des candidats | 56 |
| 5.3.2 | Polymorphisme nucléotidique des T3Es candidats d'avirulence et distribution mondiale | 66 |
| 5.3.3 | Validation fonctionnelle de la fonction d'avirulence des T3Es sur AG91-25 (E6) | 67 |
| 5.4 | Quelles sont les forces majeures modelant l'évolution du complexe d'espèces <i>R.solanacearum</i> , et les composantes du potentiel évolutif ? | 70 |
| 5.5 | L'ennemi public phylotype I- comment le cerner à plusieurs échelles..... | 78 |
| 5.5.1 | Mieux connaître la variabilité mondiale (génotypage egl-mutS) | 78 |
| 5.5.2 | Des marqueurs pour l'épidémiologie moléculaire : les MLVA..... | 79 |
| 5.5.3 | L'Afrique, lieu de diversité insoupçonnée..... | 80 |
| 5.5.4 | Structuration des populations à l'échelle d'un pays : le cas de la Côte d'Ivoire..... | 82 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.5.5 | Comment une population parcellaire s'adapte à la résistance de l'aubergine AG91-25 (ou pas.....) | 87 |
| 6 | Conclusions et perspectives | 91 |

CHAPITRE 3. LE PROJET : Importance du compartiment sauvage dans l'émergence d'épidémies bactériennes- approche par la génomique des populations..... 97

| | | |
|-----|---|------------|
| 1 | Objectifs | 97 |
| 2 | Le modèle : les <i>Xanthomonas</i> vasculaires du bananier (<i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>musacearum</i>)..... | 98 |
| 2.1 | Le flétrissement bactérien du bananier | 98 |
| 2.2 | L'espèce <i>Xanthomonas vasicola</i> | 101 |
| 2.3 | Le pouvoir pathogène sur bananier, caractère polyphylétique chez <i>Xanthomonas</i> ?... | 103 |
| 2.4 | Un modèle intéressant pour la génomique de l'adaptation des <i>Xanthomonas</i> | 103 |
| 3 | Le projet | 104 |
| 3.1 | Des séquences génomiques de qualité..... | 104 |
| 3.2 | Des marqueurs adaptés à l'épidémiologie moléculaire..... | 104 |
| 3.3 | Reconstituer l'origine de l'émergence de Xvm : le cas de l'Ethiopie | 105 |
| 3.4 | Reconstruire les routes d'invasion de Xvm en Afrique | 106 |
| 4 | Apports du projet, perspectives/retombées attendues | 107 |
| | Références bibliographiques | 108 |

CHAPITRE 1 : Parcours scientifique et professionnel

1 Curriculum-vitae

Emmanuel WICKER

Né le 3 Mai 1971 à Paris 12^{ème}

Nationalité française

Marié, 3 enfants

Adresse professionnelle :

CIRAD, UMR PVBMT

Pôle de Protection des Plantes

7 chemin de l'IRAT

F-97410 SAINT PIERRE Cédex

Île de La Réunion

Tel: 02 62 49 92 42

Email : wicker@cirad.fr



1.1 Cours universitaire

2001 : Doctorat de Phytopathologie. Caractérisation biologique et moléculaire des populations françaises d'*Aphanomyces euteiches* Drechs., l'agent de la pourriture molle du pois. Ecole doctorale Vie-Agri-Santé ENSAR / Université de Rennes 1. Directeur de thèse : F. Rouxel (INRA)

1994 : Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (DESS) en Technologies du Végétal. Université d'Angers, Faculté des Sciences

1993 : Maîtrise de Sciences et Techniques en Chimie et biologie Végétales, Université Claude Bernard-Lyon 1

1991 : DEUG B, option Biologie des Organismes et Populations, Université Claude Bernard-Lyon 1

1.2 Cours professionnel

- **Depuis le 1^{er} Août 2008 : Phytopathologiste/bactériologiste** au Pôle de Protection des Plantes du CIRAD de l'île de la Réunion
 - UMR "Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical", Equipe « Génome et interactions biotiques »
- **2002-2008 : Phytopathologiste** au CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), Pôle Agro-Environnemental de Martinique (PRAM), Le Lamentin (Martinique)
 - UR 27-Horticulture, devenue UR HORTSYS en 2007
- **1996-2002 : Ingénieur d'étude** de l'Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes Riches en Protéines (UNIP), mis à disposition de l'INRA- UMR Bi03P, basé à l'INRA de Rennes-Le Rheu
 - CDI, en charge du programme de recherche INRA-UNIP "*Aphanomyces euteiches* sur pois: diversité des populations et relations avec les propriétés du sol"

2 Activités d'enseignement et de formation

2.1 Formation initiale

- **Enseignement de Microbiologie végétale** : 2 h/an
 - 2013 : Master 2 Biodiversité et écosystèmes tropicaux (BEST) Parcours « Biodiversité et écosystèmes cultivées » - l'Université de la Réunion; 2 h
 - 2011, 2012 : Master 2 « Protection des Plantes et environnement » - AgroParisTech : 2h

2.2 Formation continue

- **Organisation d'une formation « Génomique des populations »** (5 jours) avec Christophe LEMAIRE (Université d'Angers), Septembre 2011, pour 16 participants :
 - 6 Chercheurs (CIRAD)
 - Enseignants-Chercheurs (Univ Réunion, MNHN)
 - 1 Professeur (Univ Réunion)
 - 1 Post-Doctorant (CIRAD)
 - Doctorants (CIRAD, Univ Réunion)
 - 2 ingénieurs CDD (CIRAD, IFREMER)

- **Co-organisation de la Journée Technique « Quel avenir pour la production de Tomate en Martinique ? »**, organisée par la Chambre d'Agriculture au CDST St Pierre, le 6 Février 2006.
 - 3 chercheurs (CIRAD), 4 Techniciens de l'Agriculture (Ch.Agri.972, FREDON, SOCOPMA), 65 agriculteurs

- **Organisation de la Formation « Maladies telluriques en cultures maraîchères »**, axée prioritairement sur les maladies microbiennes (champignons, oomycètes, bactéries, virus). Pôle de Recherche Agro-Environnementale de Martinique, 19 Octobre 2005. Formateur principal.
 - 11 techniciens de l'agriculture (Ch.Agri.972, FREDON, SOCOPMA, PHYTOCENTER)

- **Organisation de la Formation « Lutte intégrée contre les maladies telluriques en cultures maraîchères »**, Pôle de Recherche Agro-Environnementale de Martinique, 20 Octobre 2005. Formateur principal.
 - 11 techniciens de l'agriculture (ChAgri972, FREDON, SOCOPMA, SECI, PHYTOCENTER)

- **Organisation de Formation « Atelier greffage de tomate sous serre »**, Station Petit Morne, Le Lamentin, Martinique, 4 Novembre 2005. Formateur avec 2 techniciens CIRAD
 8 techniciens agricoles (ChAgri972, SOCOPMA, SECI), 2 agriculteurs, 1 pépiniériste

2.3 Formation à et par la recherche

2.3.1 Accueil de doctorants et chercheurs

- Sylvia SALGON (1er Avril 2014-Avril 2017), dans une **thèse de doctorat** de l'Université de la Réunion (co-encadrement) sous un financement CIFRE (CIRAD-ARMEFLHOR), sur le sujet : «Déterminisme génétique de la résistance à *Ralstonia solanacearum* chez l'aubergine et bases de sa durabilité en sélection variétale ». Taux d'encadrement : 40%
- Jérémy GUINARD (15 Décembre 2012 -15 Décembre 2015), de l'Université de la Réunion, dans le cadre d'une **thèse de doctorat** (encadrant principal) cofinancée par l'Université

de la Réunion et le CIRAD, sur le sujet : « Dynamique évolutive du contournement de la résistance de l'aubergine par *Ralstonia solanacearum* - Approches globale et locale de la durabilité de résistance ». Taux d'encadrement 80%

- Aya Carine N'GUESSAN (22 Septembre 2009-29 Novembre 2012), de l'Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY d'ABIDJAN (Côte d'Ivoire), dans le cadre d'une **thèse de Doctorat** (co-directeur) financée par l'Agence Universitaire de la Francophonie et le CIRAD-DRS, soutenue le 6 Juillet 2013 à Abidjan sur le sujet : « Phylogénie, structure génétique et diversité de virulence de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien en Côte d'Ivoire ». Taux d'encadrement : 80%
- Amaala MUHAMAD, du 1er Décembre 2007 au 1er Décembre 2015 ?, dans une **thèse de doctorat** de l'University of the West Indies (co-encadrement), sur le sujet « Diversity, phylogeny and evolution of *Ralstonia solanacearum* strains in the Caribbean affecting Bananas, Tomatoes, and their associated weeds ». Taux d'encadrement : 30%

2.3.2 Encadrement d'étudiants (DUT, BTS, Master, VSC)

Encadrement de 6 étudiants BTS/DUT, 5 étudiants M1, 9 étudiants M2, 2 VCAT/VSC.

1999

- Catherine ABJEAN-UGUEN, stage de Maîtrise « Biologie cellulaire et physiologie » (**équivalent Master 1**) de l'Université de Bretagne Occidentale-Brest, sur le sujet « Etude de la variabilité morphologique, biologique et parasitaire de souches monosporees d'*Aphanomyces euteiches* » (4 mois)

2000

- Valérie MORIN, stage de Diplôme Universitaire de Formation Appliquée aux Sciences et Techniques (DUFAS, **équivalent Master 2**) de l'Université de Pau et Pays de l'Adour, sur le sujet : « Caractérisation biologique et moléculaire d'isolats d'*Aphanomyces euteiches*, à l'échelle parcellaire » (6 mois). Taux d'encadrement : 100%

2003

- Gaël MIRENIN, stage de 2^{ème} année BTSA « Technologies du Végétal », LEGTA de Croix-Rivail, Ducos, sur le sujet « Etude de la gamme d'hôte de souches de *Ralstonia solanacearum* sur Solanacées et Cucurbitacées maraichères » (2.5 mois)

2004

- Cyril BONNELLES, stage de DESS (**équivalent Master 2**) de l'ENSA Rennes, sur le sujet : « Détection de *R.solanacearum* dans les eaux et le sol » (6 mois). Taux d'encadrement : 100%
- Fabrice BLU, Volontaire de la Coopération et Aide Technique (**VCAT, niveau BTS**), sur le sujet : « Evaluation de la résistance des principales variétés d'anthurium standard et hybride à *Ralstonia solanacearum* » (Juillet 2002-Juillet 2004, 24 mois), collaboration avec Claire AMAR (CIRAD Guadeloupe) et Guy ANAIS (INRA-CADH Guadeloupe)

2005

- Adeline HONORE, stage de 2^{ème} année BTS Biochimie du Lycée Bellevue de Fort-de-France, sur le sujet : « Essais méthodologiques de détection de *Ralstonia solanacearum* dans les eaux des rivières et d'irrigation » (3.5 mois)
- Jessie-Anne TARRIEU, stage de 2^{ème} année BTS Bioanalyses et Contrôles du Lycée Bellevue de Fort-de-France, sur le sujet : « Détection et quantification de *Ralstonia solanacearum* dans le sol et l'eau » (3.5 mois)
- Astrid-Kim RAIMBAULT, stage d'IUP « Productions Végétales » de l'INHP Angers (**équivalent Master 1**), sur le sujet : « Mise au point d'outils de détection moléculaire de *Ralstonia solanacearum* dans le sol et l'eau » (4 mois)

2006

- Sébastien CADASSE, stage de 2^{ème} année du BTSA « Technologie du Végétal », LEGTA de Croix-Rivail, Ducos, sur le sujet : « Résistance de la tomate au flétrissement bactérien en Martinique – essais variétaux et de greffage » (2.5 mois)

2007

- Audrey REMI-ZEPHYR, BTS Bioanalyses et Contrôles du Lycée Bellevue de Fort-de-France, sur le sujet : « Essais méthodologiques de suivi microbiologique et moléculaire de *Ralstonia solanacearum* dans les différents sols de la Martinique » (2.5 mois)
- Accueil au PRAM (7 jours) et co-encadrement de Paul SAUBOUA, stage de césure de l'ENITA Bordeaux (Maître de stage : Claudie PAVIS, INRA Guadeloupe), sur le sujet : « Identification des souches de *R.solanacearum* présentes en Guadeloupe et évaluation d'hybrides INRA de tomates pour leur résistance aux maladies à bégomovirus PYMV et TYLCV, et au flétrissement bactérien » (6 mois). Taux d'encadrement : 30%

2008

- Emmanuelle NERETTI, stage de **Master 2 Professionnel** « Gestion de la qualité des Productions Végétales » option « Phytoprotection » de l'Université d'Avignon, sur le

sujet : « Etude de la structuration des populations de *Ralstonia solanacearum* en Martinique par le phylotype et la géographie » (6 mois). Taux d'encadrement : 100%

2010

- Flora PENSEC, stage de **spécialisation d'ingénieurs (équivalent Master 2)** « Santé du Végétal et Environnement » (SEVE) d'AgroCampus Ouest-Angers-INHP, sur le sujet intitulé : « Exploration des facteurs génétiques liés à la spécificité de virulence de *Ralstonia solanacearum* sur aubergine et tomate » (6 mois). Taux d'encadrement : 100%

2011

- Emilie MORIN, stage de Deuxième année d'Ingénieur agronome (**équivalent Master 1**) du 16 Mai au 19 Août 2011, de Supagro Montpellier dans le cadre de sa, sur le sujet : « Résistance de l'aubergine au flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) : cartographie génétique de la résistance de MM195 et caractérisation phénotypique de l'interaction *Ers1 / popP2* » (4 mois)
- Participation à l'encadrement de Manuella NORESKAL, stagiaire du Coursus Ingénieur agronome et Diplôme d'Agronomie Approfondie (**équivalent Master 2**) d'AgroParisTech (maîtres de stage : Luc Lebreton (SALIM) et Pierre Bouteiller (EFLEFPA)), sur le sujet : « Typologie des pratiques agricoles sur Solanacées et diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent causal du flétrissement bactérien en Guyane » (6 mois). Taux d'encadrement : 15%

2012

- Pierre RIVIERE, stage de 2^{ème} année D.U.T Génie biologique option « industrie alimentaire et biologique », de l'IUT de la Réunion-Saint Pierre, sur le sujet : « Caractérisation phénotypique et moléculaire de souches Guyanaïses de *Ralstonia solanacearum* » (3 mois)
- Jérémy GUINARD, **Master 2 en sciences et technologies** "Agronomie et agroalimentaire" (STIDAD/SEPMET), de Montpellier SupAgro, sur le sujet : « Structuration génétique d'une population parcellaire de *Ralstonia solanacearum* et impact d'une culture d'aubergine résistante » (6 mois). Taux d'encadrement : 80%
- Participation à l'encadrement de Julie LAUNAY, stagiaire ingénieur (**équivalent Master 2**) de l'Ecole Supérieure d'Agro-développement International (ISTOM) (Maîtres de stage : Jean Guyot et Peninna Deberdt (CIRAD)) sur le sujet : « Etude de la faisabilité d'une méthode de lutte innovante et agroécologique contre le flétrissement bactérien : cas de la Guyane » (6 mois) Taux d'encadrement : 10%

2013

- Lakshmi SUJEEUN et Anaïs DAMOUR, du **Master 1** Biodiversité et EcoSystèmes Tropicaux (BEST) de l'Université de la Réunion, sur le sujet : « Impact d'une culture d'aubergine résistante sur la dynamique spatio-temporelle et la diversité d'une population parcellaire de *Ralstonia solanacearum* » (2 mois).
- Anne LATREILLE, du **Master 2** Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux (BEST) de l'Université de la Réunion, sur le sujet : « Développement d'un schéma « Multi-Locus VNTR Analysis » (MLVA) pour l'analyse de la structuration génétique d'une population parcellaire de *Ralstonia solanacearum* sous pression de sélection variétale » (6 mois).
Taux d'encadrement : 65%
- Co-encadrement de Sylvia SALGON, VSC CIOM Résistance de l'aubergine (Mars 2012 à Décembre 2013), avec J. DINTINGER

2014

- Lakshmi SUJEEUN, du **Master 2** Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux (BEST) de l'Université de la Réunion, sur le sujet : « Rôle des effecteurs de type III dans l'interaction *Ralstonia solanacearum*/aubergine : approches de génétique évolutive et fonctionnelle » (6 mois). Taux d'encadrement : 80%

3 Responsabilités administratives

- Membre de l'équipe « Génomes et Interactions Biotiques » de l'UMR PVBMT depuis Août 2008,
 - responsable hiérarchique et encadrement d'un technicien serriste (CAP) et d'une technicienne de laboratoire (DUT).
- Référent dans le système de management qualité (SMQ) de la Plateforme 3P, et notamment pour les procédures "Gestion des espaces de travail" et "Equipements":
 - référent 3 espace «Biologie moléculaire ».
 - référent 2 famille d'équipements « Pipettes ».
- Responsable du laboratoire de Phytobactériologie et Biologie Moléculaire du PRAM (CIRAD Martinique) de Février 2002 à Juin 2008
 - Montage du laboratoire de Biologie Moléculaire, opérationnel en Octobre 2004
 - Encadrement direct de deux techniciennes (BTS)

- une technicienne de laboratoire (BTS) pour les activités de microbiologie- biologie moléculaire
- une technicienne horticole, pour les suivis d'essais sur plants en serre et terrain
- Interaction avec 2 techniciens horticoles et un ouvrier (équipe Agronomie Maraîchage)
- Montage du dossier d'Agrément « Installations de Quarantaine Végétale » de niveau NS2, audité en Novembre 2003 ; Agrément obtenu en Janvier 2004, renouvelé après audit complémentaire du 5 Mai 2006
- Participation à la mise en place du Système Qualité-Sécurité-Environnement (QSE) du PRAM en 2006

4 Animation et administration de la recherche

4.1 Evaluation de la recherche

- J'ai été Referee pour les revues scientifiques suivantes, à raison de 2 revues/an en moyenne depuis 2008 (Tableau ci-après).

| Journal | IF (JCR_2013) | 2002 | 2008 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | TOTAL |
|--|------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| European Journal of Plant Pathology | 1.71 | 1 | 2 | | | | | 2 | 5 |
| Plant Pathology | 2.97 | | | | 1 | | 1 | | 2 |
| African Journal of Microbiology Research | NA | | | | | | | 1 | 1 |
| Plos Pathogens | 8.06 | | | | | 1 | | | 1 |
| Soil Biology and Biochemistry | 4.41 | | | 1 | | | | | 1 |
| BMC Microbiology | 2.98 | | | | | | 1 | | 1 |
| Plant Molecular Biology Reporter | 2.37 | | | | | | | 1 | 1 |
| Journal of Plant Pathology | 0.77 | | | | | | | 1 | 1 |
| TOTAL | | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 | 13 |

- J'ai participé au **Jury d'Habilitation à Diriger des Recherches** de Marie-Laure PILET-NAYEL, en tant qu'examinateur. Cette soutenance a eu lieu le 27 Mai 2014 à l'INRA de

Rennes-Le Rheu, sur le thème : « Génétique quantitative et comparative de la résistance aux maladies des plantes ».

4.2 Projets de recherche

- Co-coordonateur du projet « Gestion Durable des Résistances de l'aubergine à *Ralstonia solanacearum* » (RESAUBER, 160. 5 K€ obtenus / 495.5K€ total, 2014-2016), dans le cadre d'un appel d'offres du CASDAR-CTPS (Ministère de l'Agriculture). Partenaires : CIRAD (Réunion et Guyane), INRA Avignon, LIPM Toulouse, ARMEFLHOR, TECHNISEM ; l'Université VirginiaTech est partenaire externe.
- Responsable des projets « Ressources pour la résistance des Solanées maraîchères à *Ralstonia solanacearum* : déterminisme génétique, mécanismes et durabilité » (GENETOM1, 2008-2010) et « Evaluation de la durabilité de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine par l'étude de la dynamique du contournement » (GENETOM3, 2011-2013), sous financement FEDER UE/région Réunion.
- Partenaire scientifique du contrat de recherche « RESISTANCE DES SOLANACEES A RALSTONIA SOLANACEARUM » (2007-2010), financé par un consortium de 6 semenciers
- Co-rédacteur (avec P. FERNANDES) du projet « Introduction de plantes assainissantes dans des systèmes de culture innovants en Martinique : Impact sur la biodiversité microbienne et le parasitisme tellurique » (2008-2010), dans le cadre d'un appel d'offres du Ministère de l'Outre-Mer (MOM).

4.3 Animation de la recherche

- Membre du réseau « Gestion Durable des Résistances » INRA-IRD-CIRAD-Interprofessions, coordonné par C.CARANTA et C. LANNOU, INRA
- Membre de la Société Française de Phytopathologie depuis 1998
- Membre du Comité d'Organisation de la 12^{ème} *International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* (ICPPB) en Juin 2010 à Saint-Denis de la Réunion
- Participation aux réunions et Animations Scientifiques « Génétique des Populations » de l'Université Réunion/IFREMER/CIRAD/IRD (2010-2014)

- Co-responsable des Animations Scientifiques du PRAM Martinique de 2003 à 2005
- Organisation d'un atelier régional (financement FCR Guadeloupe) d'une semaine au PRAM, pour montage du projet INTERREG ATOCA : partenaires Trinidad, Cuba, Guadeloupe (Novembre 2007)

4.4 Réseau de recherche pour montage de projet

- Partenaire scientifique du projet ACP-UE « Development of Sustainable Integrated Disease Management strategies for vegetable crops in the Carribean » (2013-2015), qui regroupe des équipes de recherche des petites Antilles (Trinidad-et-Tobago, St Vincent, Guyana, Martinique), des USA, et de la Réunion.
- Organisation d'un atelier régional (financement du Fonds de Coopération Régionale de Guadeloupe) d'une semaine au PRAM (3-7 Novembre 2007), pour le montage du projet INTERREG « Adaptation of tomato to biotic stresses in the Carribean » (ATOCA) : 7 chercheurs participants, du CIRAD, INRA Guadeloupe, Trinidad (Univ. Of the West Indies), Cuba (CENSA et IIHLD).
- Missions à Trinidad (Université de West Indies (UWI)-Campus de St Augustine, 9-12 Mai 2006) et à Cuba (« Instituto de Investigaciones de Hortalizas Liliana Dimitrova » (IIHLD) et « Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria » (CENSA), 13-20 Mai 2006) pour montage du projet ATOCA, financées par le FCR

4.5 Contrats de recherche

- Projet «Gestion Durable des Résistances de l'aubergine à *Ralstonia solanacearum*» (RESAUBER, 160.5 K€ obtenus / 495.5K€ total, 2014-2016), dans le cadre d'un appel d'offres du CASDAR-CTPS (Ministère de l'Agriculture). **Coordinateur**
- Contrat de recherche « RESISTANCE DES SOLANACEES A RALSTONIA SOLANACEARUM » (2007-2010), financé par un consortium de 6 semenciers. **Partenaire**

4.6 Expertises

- 2007 : « Project Grenada-Vitropic / Moko survey in Grenada » : expertise scientifique et prospection en bananeraies (7 jours) dans le cadre d'un projet d'assistance spéciale au Gouvernement de Grenade pour remettre en état la filière bananière Grenadienne (financement MAE, 500.2 k€ total)

- 2005 : Expertises « Agronomic and plant disease issues for vegetable production » du 14 au 18 Novembre (5 jours), à la Dominique, Saint Kitts-and-Nevis, et « Diagnostic of Diseases in vegetable and banana crops » à la Grenade (2 jour), pour l'Organisation des Etats de l'Est Caribéen (OECS), financement Fonds de Coopération Régionale (M.A.E.)
- 2004 : Expertises « Phytopathological issues in vegetable crops and propositions for regional cooperation » du 11 au 15 Novembre (5 jours), à Sainte-Lucie et Saint-Vincent pour l'Organisation des Etats de l'Est caribéen (OECS), financement Fonds de Coopération Régionale (M.A.E.)

5 Production scientifique

5.1 Publications dans des revues à comité de lecture

[Facteur d'impact ISI 2013; Nombre de citations Web of Science 2013]

Publications soumises

Guinard Jérémy, Latreille Anne, Guérin Fabien, Poussier Stéphane, Wicker Emmanuel.

2015. A new MLVA scheme for fine-tune monitoring and microevolution study of *Ralstonia solanacearum* phylotype I populations. Soumis à *BMC Microbiology*.

Guinard Jérémy, Vinatzer Boris, Poussier Stéphane, Lefeuvre Pierre, and Wicker

Emmanuel. 2015. Draft Genome sequence of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*). Soumis à *Genome Announcements*.

2015

1. **Pensec Flora, Lebeau Aurore, Daunay MC, Chiroleu Frédéric, Guidot Alice, Wicker Emmanuel**. 2015. Towards the identification of Type III effectors associated to *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant. *Phytopathology* (Online First) [I.F.:3.119; NC: 0]
2. **Clarke, C. R., Studholme, D. J., Weisberg, A., Hayes, B., Runde, B., Cai, R., Wroblewski, T., Daunay, M. C., Castillo, J., Wicker, E., and Vinatzer, B.** 2015. Genome-enabled

phylogeographic investigation of the quarantine pathogen *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 and screening for sources of resistance against its core effectors. *Phytopathology* 105(5):597-607 [I.F.:3.119; NC: ?] doi:10.1094/PHYTO-12-14-0373-R.

3. **Kone D., Dao S., Tekete C., Doumbia I., Koita O., Abo K., Wicker E., Verdier V.** 2015. Confirmation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* causing cassava bacterial blight in Ivory Coast. *Plant Disease* (ahead of print) [IF: 2.742; NC: ?]
4. **Sikirou R., Zocli B., Paret M. L., Deberdt P., Coranson-Beaudu R., Huat J., Assogba-Komlan F., Dossoumou M. E. E. A., Simon S., Wicker E.** 2015. First Report of Bacterial Wilt of Gboma (*Solanum macrocarpon*) Caused by *Ralstonia solanacearum* in Benin. *Plant Disease* (online First) [IF: 2.742; NC: ?]

2014

5. **Clarke C.R., Hayes B.W., Runde B.J., Wicker E., Vinatzer B.A.** 2014. Eggplant and related species are promising genetic resources to dissect the plant immune response to *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas euvesicatoria* and to identify new resistance determinants. *Molecular plant pathology*, **15** (8) : 814-822. [IF: 4.485 ; NC : 0]
6. **Deberdt P., Guyot J., Coranson Beaudu R., Launay J., Noreksal M., Rivière P., Vigné F., Laplace D., Lebreton L., Wicker E.** 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana Expands Knowledge of the "Emerging Ecotype". *Phytopathology*, **104** (6) : 586-596. [IF: 2.968 ; NC : 1]

2013

7. **Lebeau A., Gouy M., Daunay M.C., Wicker E., Chiroleu F., Prior P., Dintinger J.** 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theoretical and applied genetics*, **126** (1) : 143-158. [IF: 3.507 ; NC : 6]
8. **N'Guessan C.A., Brisse S., Le Roux-Nio A.C., Poussier S., Koné D., Wicker E.** 2013. Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of microbiological methods*, **92** (3) : 366-374. [IF: 2.096 ; NC : 8]

2012

9. **Deberdt P., Perrin B., Coranson Beaudu R., Duyck P.F., Wicker E.** 2012. Effect of *Allium fistulosum* extract on *Ralstonia solanacearum* populations and tomato bacterial wilt. *Plant Disease*, **96** (5) : 687-692. [IF: 2.455 ; NC : 2]

10. **N'Guessan C.A., Abo K., Fondio L., Chiroleu F., Lebeau A., Poussier S., Wicker E*, Koné D***. 2012. So near and yet so far: The specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Côte d'Ivoire in Africa. *Phytopathology*, **102** (8) : 733-740. [IF: 2.968 ; NC : 2] *co-dernier auteur
11. **Ramsubhag A., Lawrence D., Cassie D., Fraser R., Umaharan P., Prior P., Wicker E.** 2012. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. *Plant pathology*, **61** (5) : 844-857. [IF: 2.729 ; NC : 5]
12. **Wicker E., Lefeuvre P., De Cambiaire J.C., Lemaire C., Poussier S., Prior P.** 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME Journal*, **6** : 961-974. [IF: 8.951 ; NC : 22]

2011

13. **Lebeau A., Daunay M.C., Palloix A., Wang J.F., Dintinger J., Chiroleu F., Wicker E., Prior P.** 2011. Bacterial wilt resistance in Tomato, Pepper, and Eggplant : genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology*, **101** (1) : 154-165. [IF: 2.968 ; NC : 25]
14. **Muñiz Y., Granier M., Caruth C., Umaharan P., Marchal C., Pavis C., Wicker E., Martínez Y., Peterschmitt M.** 2011. Extensive settlement of the invasive MEAM1 population of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in the Caribbean and rare detection of indigenous populations. *Environmental Entomology*, **40** (5) : 989-998. [IF: 1.561 ; NC : 3]

2010

15. **Aribaud M., Jégo S., Wicker E., Fock I.** 2010. *Ralstonia solanacearum* induces soluble amine-oxidase activity in *Solanum torvum* stem calli. *Plant physiology and biochemistry*, **48** (9) : 787-796. [IF: 2.402 ; NC : 1]
16. **Hamza A.A., Robène-Soustrade I., Boyer C., Laurent A., Jouen E., Wicker E., Prior P., Pruvost O.** 2010. A new type of strain of *Xanthomonas euvesicatoria* causing bacterial spot of tomato and pepper in Grenada. *Plant disease*, **94** (10) : 1264. [IF: 2.387 ; NC : 2]
17. **Remenant B., Coupat-Goutaland B., Guidot A., Cellier G., Wicker E., Allen C., Fegan M., Pruvost O., Elbaz M., Calteau A., Salvignol G., Mornico D., Mangenot S., Barbe V., Medigue C., Prior P.** 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, **11** (379): 1-16. [IF: 4.206 ; NC : 48]

2009

18. **Mahbou Somo Toukam G., Cellier G., Wicker E., Guilbaud C., Kahane R., Allen C., Prior P.** 2009. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant disease*, **93** (11) : 1123-1130. [IF: 2.387; NC : 16]
19. **Moussart A., Wicker E., Le Delliou B., Abelard J.M., Esnault R., Lemarchand E., Rouault F., Le Guennou F., Pilet-Nayel M.L., Baranger A., Rouxel F., Tivoli B.** 2009. Spatial distribution of *Aphanomyces euteiches* inoculum in a naturally infested pea field . *European journal of plant pathology*, **123** (2) : 153-158. [IF: 1.931; NC : 7]
20. **Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu R., Mian D., Prior P.** 2009. Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant pathology*, **58** (5) : 853-861. [IF: 2.368; NC : 12]

2007

21. **Wicker E., Grassart L., Coranson Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Fegan M., Prior P.** 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and environmental microbiology*, **73** (21) : 6790-6801. [IF: 4.004 ; NC : 47]

2003

22. **Wicker E., Moussart A., Duparque M., Rouxel F.** 2003. Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. *European journal of plant pathology*, **109** (1) : 47-60. [IF: 1.931; NC : 20]

2001

23. **Wicker E., Hulle M., Rouxel, F.** 2001. Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology* **50**(4): 433-442. [IF: 2.368; NC : 19]
24. **Wicker E., Rouxel F.** 2001. Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *European journal of plant pathology* **107**(9) : 919-929. [IF: 1.931; NC : 17]

Tableau de synthèse des publications

| Journaux | NB | I.F. (JCR 2014) | I.F. sur 5 ans |
|--|-----------|--------------------|-------------------|
| ISME Journal | 1 | 9.302 | 9.438 |
| Molecular plant pathology | 1 | 4.724 | 4.54 |
| BMC Genomics | 1 | 3.986 | 4.36 |
| Theoretical and applied genetics | 1 | 3.79 | 3.986 |
| Applied and environmental microbiology | 1 | 3.668 | 4.359 |
| Phytopathology | 5 | 3.119 | 3.327 |
| Plant Disease | 5 | 3.02 | 3.04 |
| Plant physiology and biochemistry | 1 | 2.756 | 3.33 |
| Plant pathology | 3 | 2.121 | 2.571 |
| Journal of Microbiological Methods | 1 | 2.026 | 2.338 |
| European journal of plant pathology | 3 | 1.49 | 1.649 |
| Environmental Entomology | 1 | 1.295 | 1.689 |
| Total général | 24 | | |

5.2 Publications sans comité de lecture

15 publications.

1. **Lett J.M., Péréfarres F., Hoareau M., Lefeuvre P., De Bruyn A., Dottin M., Prior P., Wicker E., Umaharan P.** 2011. Tomatoes showing yellow leaf curl symptoms in the island of Grenada exhibit an infection with Tomato yellow leaf curl virus either alone or in combination with potato yellow mosaic virus. *New disease reports*, **24** : 19.
2. **Wicker E., Coranson-Beaudu R., Cadasse S., William M.A.** 2009. Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in the French West Indies raise new challenges to tomato breeders. In : Saygili H. (ed.), Sahin F. (ed.), Aysan Y. (ed.). *Proceedings of the second international symposium on tomato diseases. Acta Horticulturae* 808: 279-286.
3. **Chabrier C., Mbolidi-Baron H., Wicker E.** 2005. Techniques de lutte alternative. *Les Cahiers du PRAM* (5) : 43-49.
4. **Lavigne C., Wicker E., Mbolidi-Baron H., Salmon F., Horry J.P.** 2005. L'amélioration variétale : un outil pour l'agriculture biologique. *Les Cahiers du PRAM* (5) : 31-36.
5. **Wicker E., Quénéhervé P., Urbino C.** 2005. Intérêt de la connaissance des bioagresseurs pour l'agriculture biologique. *Les Cahiers du PRAM* (5) : 37-42.

6. **Prior P., Wicker E., and Fegan, M.** (2005) The *Ralstonia solanacearum* species complex: genetic diversity, phylogeny and molecular typing of strains with a particular attention to bacterial wilts of banana known as Moko disease, Bugtok disease and Blood disease, and emerging strains. *In: II Seminario Internacional sobre Produccion, Comercializacion e Industrializacion de Platano. Manizales, Colombia*: 49-56.
7. **Wicker E., Grassart, L., Coranson, B. R., Mian, D., Guilbaud, C. and Prior, P.** Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies): a case study for epidemiology of bacterial wilt. *Acta Horticulturae* **695**, 145-152
8. **Wicker E., Grassart L., Mian D., Coranson-Beaudu R., Dufeal D., Guilbaud C., Prior P.** 2002. *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata* and *Anthurium* spp, new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Bacterial wilt newsletter* (17) : 20-21, 24.
9. **Wicker E., Moussart A., Rouxel F.** 2001.Characterisation of the populations of *Aphanomyces euteiches* in France. *Proceedings of the 4th European Conference on grain Legumes, 8-12 July, Cracovie*: 64-65.
10. **Moussart A., Wicker E., Duparque M., Rouxel F.** 2001. Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. *Proceedings of the 4th European Conference on grain Legumes, 8-12 July, Cracovie*; 272-273.
11. **Kraft J.M., Wicker E., Rouxel F.** 1998. Breeding and selection of peas for *Aphanomyces* root rot resistance. *Proceedings of the 3rd European Conference on Grain Legumes, 14-19 November, Valladolid* : 114-115.
12. **Wicker E., Rouxel F.** 1998. *Aphanomyces euteiches* on pea in France : receptivity of some soils related to their physical properties. *Proceedings of the 3rd European Conference on Grain Legumes, 14-19 November, Valladolid* : 256-257
13. **Carrouée B., Verger S., Wicker E., Seguin B.** 1996. Maladies du pois : enrayer l'extension d'*Aphanomyces*. *Perspectives agricoles* **207** : 55-59.
14. **Maufras J.-Y., Wicker E., Sanssené J.** 1996. Les maladies racinaires du pois (1) – *Aphanomyces euteiches*. *Perspectives agricoles* **226** : 68-75.
15. **Maufras J.-Y., Sanssené J., Wicker E.** 1996. Les maladies racinaires du pois (2). *Perspectives agricoles* **227** : 60-67.

5.3 Communications orales

22 communications orales.

2014

1. **N'Guessan A.C., Pensec F., Lemaire C., Lefeuvre P., Wicker E.** Molecular epidemiology and virulence typing of *Ralstonia solanacearum* raise new prospects for sustainable control of Solanaceae bacterial wilt. *The 13th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Shanghai, China, June 8-13, 2014*
2. **Wicker E.** Partner's remarks. *Inauguration Ceremony of the Workshop "Developing Integrated Systems for Plant Disease Management", UWI-St Augustine Campus, Trinidad, September 5, 2014*
3. **Wicker E.** How epidemiosurveillance and virulence typing can contribute to sustainable control of Solanaceae bacterial wilt. *Workshop "Developing Integrated Systems for Plant Disease Management", UWI-St Augustine Campus, Trinidad, September 5, 2014 (conférence invitée)*

2013

4. **Vernière C., Wicker E.** Molecular typing tools for surveillance and outbreak investigation: adapting tools to pathogen biology and spatio-temporal scales. *Root tubers and Banana Bacterial Diseases Initiative (RTB BDI) Workshop, Naivasha, Kenya, December 8-12, 2013 (conférence invitée).*

2012

5. **N'Guessan A.C., Koné D., Prior P., Wicker E.** Etude de la structure des populations ivoiriennes de *Ralstonia solanacearum* par analyse multilocus VNTR (MLVA). In : INRA ; SFP ; IRD. *10èmes Rencontres plantes-bactéries, Aussois, France, 30 janvier-03 février 2012.*
6. **Wicker E., Lebeau A., Pensec F., Daunay M.C., Dintinger J.** New insights on virulence and evolutionary dynamics of the *Ralstonia solanacearum* species complex -keys and challenges in the search of durable resistance in *solanaceae*. In : INRA MetaProgramme SMACh. *Scientific programme and abstracts of the Plant Resistance Sustainability International Conference 2012, La Colle-sur-Loup, France, 16-19 octobre 2012.*
7. **Wicker E., Lefeuvre P., De Cambiaire J.C., Lemaire C., Poussier S., Prior P.** Evolutionary history of *Ralstonia Solanacearum* inferred from MLSA. In : INRA ; SFP ; IRD. *10èmes Rencontres plantes-bactéries, Aussois, France, 30 janvier-03 février 2012.*

2008

8. **Wicker E.** Maladie de Moko et autres flétrissements bactériens du bananier. *Journée de formation Cercosporiose-Moko Bananier (CIRAD/SPV/FREDON), PRAM, le Lamentin, 4 Avril 2008.*

2007

9. **Wicker E.** Les flétrissements bactériens du bananier. *Journées de l'Unité de Recherche « Systèmes de culture à base de Bananiers et Plantains » (CIRAD, UR26), PRAM, le Lamentin, 6 Juillet 2007.*

10. **Prior P, Fegan M, Wicker E.** A global initiative to explore and survey *Ralstonia solanacearum*. *Second International Symposium on Tomato Diseases, Kusadasi, Turkey, October 8-12, 2007.*
11. **Wicker E., Coranson-Beaudu R., Cadasse S., William M.A.** Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in the French West Indies raise new challenges to tomato breeders. *Second International Symposium on Tomato Diseases, Kusadasi, Turkey, October 8-12, 2007.*

2006

12. **Wicker E., Fernandes P., Rhino B.** Comment sauvegarder les cultures maraîchères locales. In : PRAM. *Fête de la science, jeudi 12 octobre au samedi 14 octobre 2006, Madiana, Martinique.*
13. **Wicker E.** Flétrissement bactérien à la Martinique. *Journée Technique «Quel avenir pour la production de tomate en Martinique ? » (CA972-CIRAD), CDST Saint Pierre, 6 février 2006.*

2005

14. **Fernandes P., Wicker E.** Moyens de lutte non chimiques contre les maladies telluriques et nématodes phytoparasites en cultures maraîchères. In : *Réunion annuelle Flhor, Montpellier, 4-6 juillet 2005 : filières productions maraîchères et vanille.*
15. **Wicker E., Prior P.** Classification et diagnostic moléculaire du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*. In : *Réunion annuelle Flhor, Montpellier, 4-6 juillet 2005 : filières productions maraîchères et vanille.*

2004

16. **Wicker E.** Contrôler le flétrissement bactérien en cultures maraîchères en zone tropicale humide. In : *Science en fête, Fort de France, Martinique, octobre 2004.*
17. **Wicker E.** Emergence en Martinique d'une nouvelle population de *Ralstonia solanacearum*, pathogène sur cucurbitacées et anthurium. In : *6ème Rencontres plantes-bactéries, 11-15 janvier 2004, Aussois.*
18. **Wicker E., Grassart L., Coranson Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Prior P.** Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies): a case study for epidemiology of bacterial wilt. *International Symposium on Tomato Diseases, Orlando, USA, June 21-24, 2004.*

2002

19. **Luisetti J., Wicker E.** Le flétrissement bactérien à la Réunion. In : Kahane Rémi (ed.). *Productions maraîchères et horticoles : sessions lutte intégrée et agronomie.* Montpellier : CIRAD-FLHOR, 1 disque optique numérique (CD-ROM). Journées annuelles du FLHOR, 2002-08-26/2002-08-27, Montpellier, France.
20. **Wicker E.** Flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) en Martinique et à la Réunion : deux contextes spécifiques, des questions communes. In : Kahane Rémi (ed.). *Productions maraîchères et horticoles : sessions lutte intégrée et agronomie.* Montpellier :

CIRAD-FLHOR, 1 disque optique numérique (CD-ROM). Journées annuelles du FLHOR, 2002-08-26/2002-08-27, Montpellier, France.

2001

21. **Wicker E., Moussart A., Rouxel F.** Pathogenical and genotypical diversity of the French populations of *Aphanomyces euteiches*, causing the common root rot of pea. *4th European Conference on grain Legumes, 8-12 July 2001, Cracovie.*

2000

22. **Wicker E., Rouxel F.** Variabilité du pouvoir pathogène sur légumineuses d'isolats d' *Aphanomyces euteiches* originaires de France. *3èmes Rencontres de Mycologie - Phytopathologie d'Aussois- "Journées Jean Chevaugéon", 6-9 Mars 2000, Aussois.*

CHAPITRE 2 : Activités de recherche

1 Introduction

Depuis ma thèse, mes activités de recherche ont été marquées par ma formation de phytopathologiste initiale, se concentrant sur un pathosystème plutôt que sur une discipline particulière. Il y a cependant une thématique commune à ces travaux : les pathogènes telluriques, et les rapports entre écologie et adaptation à l'hôte.

Durant mon séjour à l'INRA de Rennes (1996-2001, pré-thèse et thèse), je me suis consacré à un projet de recherche en forte interaction avec des généticiens des plantes et sélectionneurs de protéagineux, pour mettre au point des stratégies de lutte contre un oomycète tellurique (*Aphanomyces euteiches*) provoquant une maladie (pourriture racinaire du pois) ré-émergente en France. Ce modèle cumulait les difficultés : nous n'avions aucun marqueur moléculaire neutre permettant d'évaluer la diversité et structuration génétique, aucun marqueur moléculaire de pathogénicité/virulence ; l'espèce hôte présentait une résistance de type quantitative dont les bases génétiques étaient inconnues. Et la génétique des populations des Oomycètes, en cette ère pré-génomique, en était à ses balbutiements. Mais c'est clairement vers la biologie des populations, mariage heureux de la génétique des populations et de l'épidémiologie (Milgroom and Peever 2003), que mon intérêt scientifique s'est tourné.

Mon séjour au CIRAD Martinique (2002-2008), humainement très riche, m'a fait revêtir les oripeaux du « pathologiste de service » dans un centre de recherche agro-centré sur les filières maraîchères et bananières, avec une couleur d'épidémiologiste de terrain. Il m'a fallu monter le laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire, avant de pouvoir m'intéresser en détail à une autre émergence, cette fois provoquée sur anthurium par la bactérie tellurique *Ralstonia solanacearum*. Dans ce mémoire, je passe sous silence les activités ayant trait à la mise au point d'outils de détection de cette bactérie dans les sols et eaux, dont l'objectif principal était d'évaluer l'efficacité de méthodes de lutte contre le flétrissement bactérien.

C'est le séjour au CIRAD Réunion (2008-2015) qui m'a permis de revenir à mes premières amours : décrypter l'évolution d'un pathogène pour guider des stratégies de gestion durable, notamment des résistances variétales. *Ralstonia solanacearum* partage de nombreux points communs avec *A.euteiches*, outre son habitat tellurique. Si les mécanismes moléculaires régissant ses interactions avec les plantes ont fait l'objet d'intenses recherches, des pans

entiers de son écologie hors pathogénèse restent inconnus et inexplorés. Sa large gamme d'hôtes et le déterminisme génétique de sa préférence d'hôte restent largement inexpliqués. Peu de sources de résistance existent, y compris parmi les apparentés sauvages, et les niveaux de résistance sont partiels pour la plupart, et de déterminisme génétique inconnu. Enfin, la part de l'inoculum d'un sol qui participe à l'initiation d'une épidémie, les mécanismes permettant l'apparition de nouveaux variants émergents, et leur origine (fraction de la population peuplant l'agrosystème ? fraction de la population venant du compartiment non cultivé ?), sont d'autres aspects méconnus, essentiels à cerner pour qui veut mettre en place des stratégies de lutte durables (lutte génétique, culturelle, ...).

Dans ce mémoire, je présenterai donc dans un premier temps mes travaux sur *Aphanomyces euteiches*, dont la structuration de populations évoque l'existence d'une « face cachée » non associée à la plante ou à l'agrosystème. La description de l'émergence en Martinique d'un nouvel écotype, en deuxième partie, alliant étiologie, épidémiologie moléculaire et épidémiologie classique, m'a fait prendre conscience de l'influence de l'environnement d'une culture (rotations, compartiment non cultivé) sur le risque d'émergence. Cette réflexion m'a également poussé à développer une double approche mêlant déterminants moléculaires des interactions pathogène-hôte en relation avec des généticiens de la plante, et biologie évolutive et génétique des populations pour comprendre et contrôler la dynamique évolutive des interactions plante-bactérie. Cette démarche m'a donné l'occasion de côtoyer et collaborer avec des phylogénéticiens, évolutionnistes, généticiens des populations que je salue ici, qui m'ont nourri et fait progresser. En troisième chapitre, je présenterai mon projet de recherche, visant à mieux comprendre l'importance du compartiment sauvage (ou non-cultivé, plus exactement) dans l'émergence d'épidémies bactériennes. Ce projet correspond également à un changement d'Unité de recherche et de lieu, et synthétise la réflexion engagée avec ma future équipe de l'UMR IPME sur la biologie des populations des *Xanthomonas*.

2 *Aphanomyces euteiches*, un parasite émergent surgi du passé

Tout a commencé par un oomycète tellurique responsable de pourritures racinaires très préjudiciables sur pois. *Aphanomyces euteiches* appartient à la classe des Oomycètes, groupe originellement assimilé aux champignons, mais qui s'est avéré être beaucoup plus proche des diatomées et algues chromophytes. Il appartient à l'ordre des Saprolegniales (une lignée différente de celle des pathogènes plus connus *Pythium* et *Phytophthora*), où il constitue le genre le plus ancestral (Gaulin et al. 2007). Il infecte les racines de pois via des zoospores

asexuées nageuses, émises par la germination d'oospores sexuées se trouvant dans les débris végétaux. Il se développe ensuite dans tout le système racinaire, dégradant les parois cellulaires végétales pour former de nouvelles oospores.

Cet organisme, primitivement décrit en 1925 dans le Wisconsin (USA) (Jones and Drechsler 1925), s'est ensuite manifesté dans différents pays d'Europe (Danemark, Suède) dès l'année 1930. Il est d'ailleurs décrit pour la première fois en France dans le Bassin Parisien à cette période (Labrousse 1933). Ce pathogène ne fait ensuite plus parler de lui jusqu'en 1993, où il commence à provoquer des dégâts très sévères dans les principaux bassins de production de pois, dans le Bassin Parisien où la culture était pourtant bien implantée depuis 50 ans, mais également en Bretagne, Centre, Rhône Alpes.

Pour comprendre cette émergence apparente, nous nous sommes attachés à caractériser la spécificité d'hôte et la virulence sur pois des populations échantillonnées en France, en regard de souches de référence européennes et américaines ; nous avons aussi tenté d'identifier les facteurs modelant la structure génétique de ces populations.

Une spécificité d'hôte peu marquée dans les populations françaises

Dans les populations américaines d'*A.euteiches* (les mieux décrites encore à ce jour), avaient été identifiés plusieurs pathotypes, dont certains -« haricot », « trèfle », « non pathogène »- semblaient constituer des lignées génétiques distinctes du pathotype « pois » (Figure 1).

Le cas des populations françaises est visiblement tout autre. Les tests de pouvoir pathogène menés sur une gamme de légumineuses (pois, vesce, luzerne, féverole, haricot) ont révélé des phénotypes de virulence, mais dont la différenciation était peu marquée, les isolats les plus polyphages (phénotype PVFAB) étant aussi les plus agressifs sur pois.

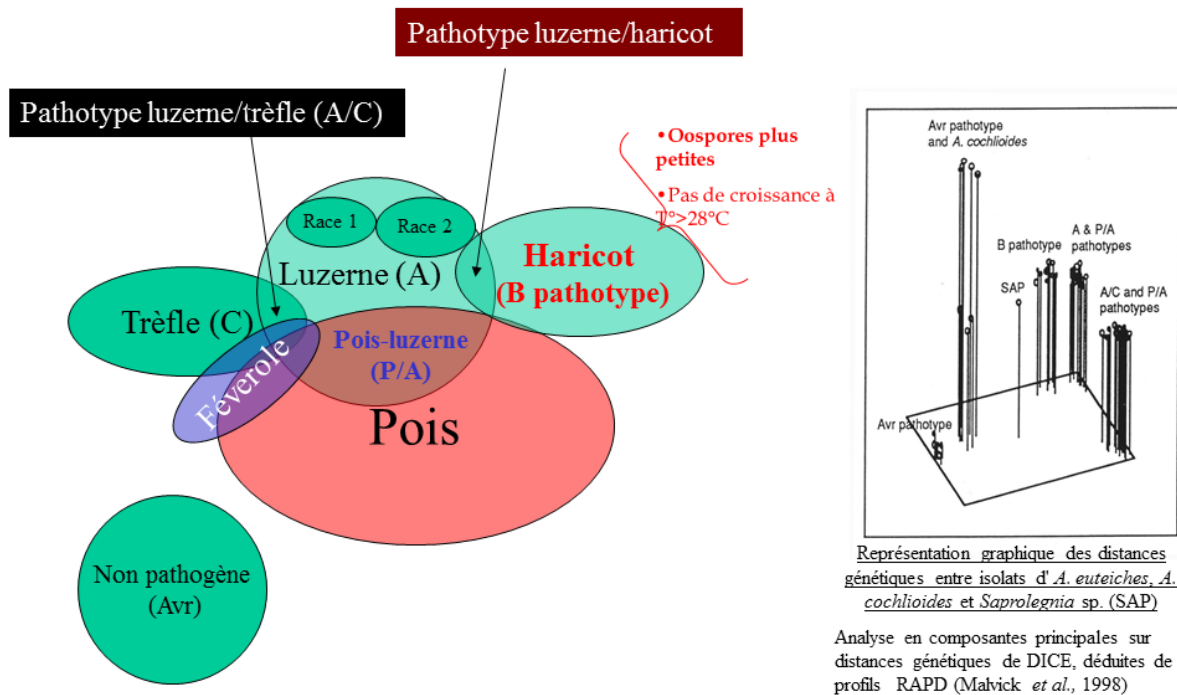


Figure 1. Caractéristiques phénotypiques (spécificité d'hôte) et génotypiques des populations américaines d'*A. euteiches* (Grau *et al.* 1991, Holub *et al.* 1991, Malvick *et al.* 1998, Munkvold *et al.* 2001)

Virulence sur pois : un pathotype dominant, une population française à virulence large et très agressive

Les bases génétiques de la résistance du pois à *A. euteiches* étant encore largement méconnues, il a fallu tout d'abord mettre au point une gamme différentielle rassemblant les sources de résistance les plus discriminantes, pour évaluer le spectre de virulence des populations françaises et leur niveau d'agressivité. Parmi les onze « types de virulence » (virulence type, VT) identifiés, les populations françaises se sont distinguées des références étrangères (notamment américaines) par leur forte agressivité, leur large spectre de virulence, et leur relative homogénéité, l'immense majorité des souches (71 sur les 82 testées) se rassemblant dans le VT 1.

Une forte diversité génétique, non structurée par la géographie et l'hôte d'origine

La diversité et la structuration génétique des populations françaises a ensuite été évaluée par analyse du polymorphisme d'amplification des fragments amplifiés (AFLP) développés

durant ma thèse (2 couples d'amorces, générant 217 loci, ou tailles de bandes, tous polymorphes), sur une collection rassemblant plusieurs échelles d'échantillonnage, de la parcelle au bassin de production. Sur cette espèce non modèle, nous ne disposions malheureusement pas à ce moment-là de marqueurs locus-spécifiques (SSRs notamment).

Une forte diversité a été ainsi révélée à tous les niveaux d'échantillonnage, avec des similarités génotypiques de 24 à 82%, et autant de génotypes que d'isolats. *A.euteiches* étant un pathogène tellurique sans moyen de dissémination à longue distance connu, une forte structuration géographique était attendue, avec une différenciation significative entre populations de parcelles différentes. Or, le niveau de différenciation entre bassins de production mais aussi entre parcelles était faible, généralement non significatif. Des analyses de variance moléculaire (AMOVA) ont montré que la plus grande partie (94%) de la diversité était distribuée dans les parcelles, avec seulement 0.14% entre champs et 5.44% entre régions. Par ailleurs aucune corrélation n'a pu être établie entre distance géographique et distance génétique sur les populations parcellaires échantillonnées.

Dans le même temps, les niveaux très hautement significatifs de déséquilibre de liaison entre loci ont indiqué une tendance marquée des populations à la clonalité.

Enfin aucune corrélation n'a pu être établie entre les groupes de spécificité d'hôte, de virulence sur pois et les génotypes AFLP identifiés ; les souches américaines de référence représentant les différents pathotypes (Figure 1) n'étaient pas génotypiquement différenciées. Il apparaît donc que les populations françaises considérées, toutes isolées de plante il est vrai, ne sont pas structurées par l'hôte ni par la géographie.

De ces différents résultats émerge donc l'image d'une population d'*A.euteiches* très variable mais non structurée, avec un mode de reproduction fortement autogame. Paradoxalement, le niveau de diversité génétique observé chez *A.euteiches* est proche de celui d'oomycètes hétérothalliques, tels que *Phytophthora infestans* à son centre d'origine ou *P. palmivora*, et bien plus hautes que des *Phytophthora* homothalliques (Grunwald and Hoheisel 2006). Cette forte diversité génétique et génotypique à toutes les échelles étudiées rend l'hypothèse d'une introduction récente très improbable, et *A.euteiches* est très probablement endémique en France.

Par ailleurs, la population française, à l'inverse des populations américaines, est très probablement polyphage et dotée de mécanismes d'adaptation transitoire au pois (l'hôte le plus fréquent) qui n'ont pas été élucidés (Figure 2).

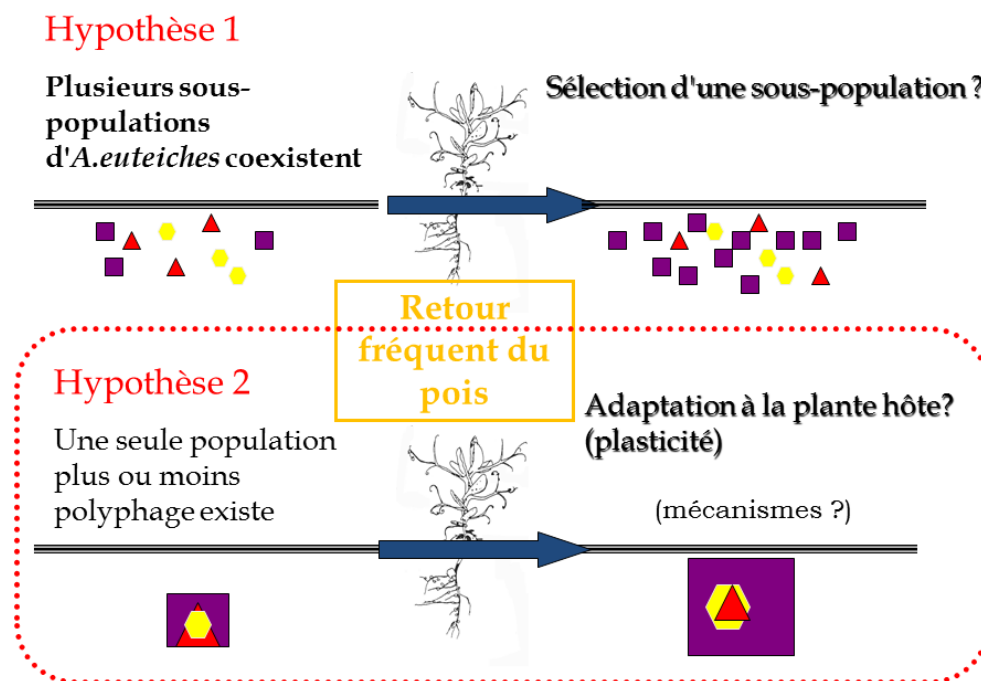


Figure 2. Hypothèses sous-tendant les études sur la structuration génétique des populations d'*Aphanomyces euteiches* par l'hôte. L'hypothèse 1 assimile la situation française à la situation Américaine : plusieurs lignées évolutives, différant génétiquement et par leur spécificité d'hôte, coexistent dans le sol. Sous l'effet de l'intensification de la culture du pois, la lignée spécialisée à cet hôte domine l'ensemble des populations présentes dans le sol. L'hypothèse 2 postule une population unique polyphage, d'où émergent des clones préférentiellement adaptés au pois.

Le contraste observé entre clonalité et forte diversité, ainsi que l'absence de structuration géographique, ont été observés également dans les populations danoises d'*A.euteiches* (S. Rosendahl, 2007). L'absence de structuration génétique par la géographie (avec notamment une absence d'isolement par la distance), surprenante pour un organisme tellurique très peu mobile, peut être expliquée par l'existence de flux de gènes importants entre les différents bassins de production ; on ne peut exclure également que les tailles efficaces de cet oomycète soient très élevées, ce qui empêcherait une différenciation entre bassins ou régions ; un tel cas de figure a déjà été observé sur des populations de nématodes d'Amérique du Sud (V. Ravigné, comm. personnelle 2015).

Nous avons donc suggéré que la structure de population de cet oomycète suivait le modèle épidémique de Maynard-Smith *et al.* (1993) ; cette hypothèse a d'ailleurs été reprise dans l'analyse de populations américaines (Grunwald and Hoheisel 2006). Selon ce modèle, il

existe une population « de fond », de grande taille, constituée de génotypes rares et non apparentés qui recombinent à haute fréquence, d'où émergent des complexes clonaux issus d'un génotype mieux adapté que les autres. Dans le cas d'*Aphanomyces euteiches*, ce modèle impliquerait :

- l'existence d'infections asexuées secondaires à partir des racines malades (via les zoospores nageuses), et donc des épidémies polycycliques. L'existence de telles épidémies a été confirmée expérimentalement par la suite (Willocquet et al. 2007).
- La probable existence d'une population environnementale, réservoir de gènes, qui n'a pas été échantillonnée au cours de ma thèse.

Ces travaux de thèse ont donné matière à trois publications de rang A. Le volet portant sur la virulence sur pois, ont servi de base aux programmes de génétique de la résistance des légumineuses (*Pisum sativum* et *Medicago truncatula*) qui ont été mis en place à l'INRA de Rennes-Le Rheu (Pilet-Nayel et al. 2001, Pilet-Nayel et al. 2005, Pilet-Nayel et al. 2007).

Wicker E, Hulle M, Rouxel F. 2001. Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology* **50**(4): 433-442. [IF: 2.368; NC : 19]

Wicker E, Rouxel F. 2001. Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *European journal of plant pathology* **107**(9) : 919-929. [IF: 1.931; NC : 17]

Wicker E, Moussart A., Duparque M., Rouxel F. 2003. Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. *European journal of plant pathology*, **109** (1) : 47-60. [IF: 1.931; NC : 20]

3 Le monde de *Ralstonia solanacearum*

Suite à mon embauche par le CIRAD en 2002, j'ai plongé dans le monde des bactéries phytopathogènes en zone tropicale, dans un centre de recherche agronomique centré sur les cultures maraîchères et bananières (le PRAM de Martinique) ; mes recherches se sont alors focalisées sur *Ralstonia solanacearum*, une Béta-Protéobactérie tellurique notamment responsable du flétrissement bactérien sur Solanacées maraîchères et de bactérioses vasculaires sur de nombreuses autres espèces. Elle a été classée 2^{ème} plus importante bactérie phytopathogène (juste derrière *Pseudomonas syringae*) (Mansfield et al. 2012).

Originellement décrit à la fin du 19^{ème} siècle (Smith 1896) comme *Bacillus solanacearum*, l'agent du flétrissement bactérien a ensuite été successivement connu sous le nom de *Pseudomonas solanacearum* puis *Burkholderia solanacearum* (Yabuuchi et al. 1992) avant d'être finalement renommé *R. solanacearum* en 1995 suite à l'analyse de séquences multilocus, notamment de l'ADNr 16S (Yabuuchi et al. 1995).

R. solanacearum possède une gamme d'hôte reconnue de plus de 250 espèces végétales dans 54 familles botaniques, ce qui atteste d'une exceptionnelle variabilité génotypique, phénotypique et écologique (Hayward 1991, Hayward 1994, Wang et al. 2000). Cet organisme attaque aussi bien des monocotylédones que des dicotylédones, et affecte des cultures de subsistance et d'exportation, considérées comme des cultures majeures pour la diversification périurbaine et les systèmes agricoles à faible revenu (Grimault et al. 1993, Silveira et al. 1998) :

- Solanacées maraîchères (tomates, piment/poivron, aubergine) dans toute la ceinture tropicale et subtropicale
- Pomme de terre en zones tropicales d'altitude (Afrique, Amérique Centrale et du Sud, Inde) et en régions tempérées (Europe, Amérique du Nord, Asie)
- Bananier dessert, plantain et Musacées ornementales en Amérique Centrale et du Sud, Afrique (Nigeria, Sénégal, Libye, Ethiopie), Inde et Asie du Sud-Est
- Forêts d'eucalyptus en Afrique du Sud et Brésil (Alfenas et al. 2006, Fonseca et al. 2014, Sambasivam and Giriya 2007, Xu et al. 2009, Yu et al. 2003)
- Arachide en Asie (particulièrement en Chine) et en Ouganda,
- Gingembre en Asie et Hawaii (Sambasivam and Giriya 2007, Xu et al. 2009, Yu et al. 2003),
- Patate douce en Chine et manioc en Indonésie (Hayward 1994).

Sa distribution géographique embrasse toute la ceinture tropicale et subtropicale, ainsi bien en plaine que dans les zones tropicales d'altitude ; elle est aussi présente dans les régions tempérées d'Europe et Amérique du Nord (Figure 3). Aux USA où elle a été aussi introduite, *Ralstonia solanacearum* est listée « Select Agent » potentiel de bio terrorisme.

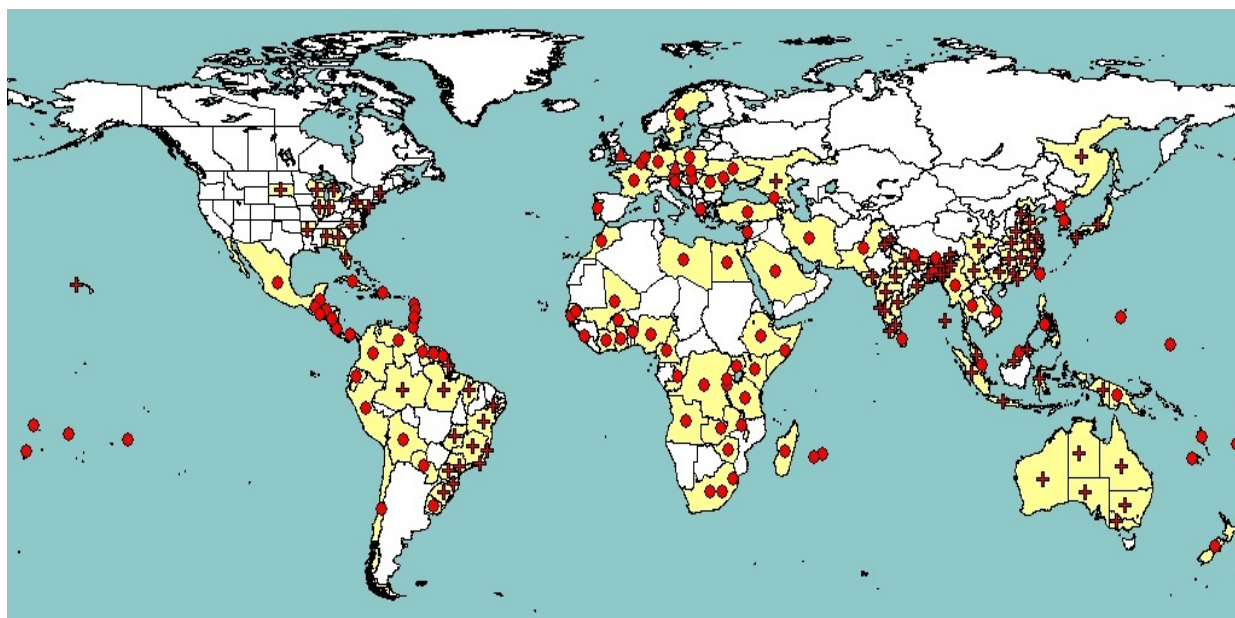


Figure 3. Distribution géographique de *Ralstonia solanacearum* (● : présent (national) ; + : présent (régional)) (OEPP, 2014)

Son cycle infectieux reste mal connu, surtout pour ce qui concerne les phases de vie hors de son hôte, dans le sol. *R.solanacearum* a une durée de vie limitée en sol nu, mais est capable de se maintenir dans la rhizosphère de nombreuses adventices, ainsi que dans les eaux de surface. Attirées par les exsudats racinaires, les cellules bactériennes atteignent les racines par tactisme, pénètrent par les ouvertures naturelles (insertions de racines secondaires, blessures), investissent le parenchyme cortical racinaire avant de coloniser les vaisseaux du xylème, pour envahir la plante entière. Il provoque donc des bactérioses vasculaires. Les hauts niveaux de population atteints dans les vaisseaux, et la perturbation des équilibres hormonaux qu'il engendre (notamment par sa production d'éthylène), induisent un symptôme caractéristique de flétrissement puis la mort de la plante. Les contaminations peuvent également avoir lieu via des blessures (outils de taille) sur les tissus caulinaires.

Lorsque les niveaux de populations sont très élevées dans les vaisseaux du xylème en fin de pathogénèse (alors que les symptômes de flétrissement commencent à apparaître), *R.solanacearum* est capable d'entrer en forme **viable non cultivable** (VNC) (Grey and Steck

2001) ; cette aptitude semble être une forme de survie activée également suite à un stress environnemental (froid, exposition au cuivre, ...), mais son importance évolutive n'est pas encore explorée.

Parmi les bactéries phytopathogènes, *R.solanacearum* se distingue sur plusieurs points :

Une plasticité génomique peu commune

Son génome complet de 5.7 Mb se compose de deux réplicons, appelés respectivement chromosome (3.7 Mb) et mégaplasme (2.1 Mb), qui partagent une longue histoire évolutive commune (Guidot et al. 2007). Le chromosome porte essentiellement les gènes essentiels à la physiologie générale de l'organisme (« gènes de ménage »), tandis que le mégaplasme contient la plupart des gènes associés à l'adaptation à l'hôte mais aussi aux changements environnementaux (Genin and Boucher 2004). La première séquence génomique (GMI1000, phylotype I (Salanoubat et al. 2002)) a montré que les deux réplicons avaient une structure en mosaïque, avec 15.9% des gènes acquis par transfert horizontal (Nakamura et al. 2004). Les dernières études de génomique comparative (Ailloud 2015) permettent de mieux cerner son core-génome : 1940 gènes, soit 17% du pangénome, et environ 35 % d'un génome moyen (~5500 gènes). Cette proportion est particulièrement faible par rapport aux génomes de même taille, tel que celui de *Pseudomonas syringae*, qui lui compte environ 3400 gènes (Baltrus et al. 2011). Un autre élément pouvant expliquer sa forte plasticité génomique, est son aptitude à la compétence *in planta*, notamment en conditions de forte infestation (Bertolla et al. 1999). Par ce mécanisme *R.solanacearum* peut ainsi échanger des fragments d'ADN de 30 à 90 kb (Coupat et al. 2008), et hausser son niveau d'agressivité sur tomate (Coupat-Goutaland et al. 2011).

Un arsenal exceptionnellement riche : 100 façons de tuer une plante (Poueymiro and Genin 2009)

Son autre originalité réside en la richesse de son répertoire en effecteurs de type III, impliqués dans la virulence sur Solanacées, mais aussi sur les espèces-modèles *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* – ce volet sera détaillé en partie 2.5.3. Alors que la plupart des bactéries phytopathogènes ont un répertoire de 20 à 30 effecteurs, celui de souches individuelles de *R.solanacearum* compte 60 à 70 effecteurs, avec un core-effectome dont la composition est sujette à discussions (cf. partie 2.5.3.).

***Ralstonia solanacearum* : à complexe d'espèces, classification complexe**

Originellement, *R.solanacearum* était subdivisé en 5 races (d'après les profils de pathogénicité sur tomate, tabac, pomme de terre) et 6 biovars (aptitude à métaboliser 6 acides et hexoses-alcools) (Buddenhagen et al. 1962, Hayward 1964); cette classification n'est absolument pas phylogénétiquement soutenue et donc complètement obsolète, mais encore utilisée par certaines équipes et l'OEPP (!). L'avènement des techniques moléculaires, et notamment les analyses de séquences multilocus, ont permis de clarifier la phylogénie et la classification. L'utilisation de RFLP avait identifié deux grandes divisions : la division I « Asiatique » et la division II « Américaine » (Cook et al. 1989, Cook and Sequeira 1994). Basée sur le polymorphisme nucléotidique des séquences ITS, *egl*, *hrpB*, *mutS*, une classification en 4 phylotypes (I, II, III, IV) a été proposée (Fegan and Prior 2005), confirmée plus tard par les premières études de génomique comparative (Guidot et al. 2007) ; ces 4 phylotypes étant corrélés à leur origine géographique, respectivement Asiatique, Américaine, Africaine, Indonésienne. La souche-type de *R.solanacearum*, K60, appartient au phylotype IIA (Remenant et al. 2012).

L'existence de clades à l'intérieur des phylotypes a été démontrée par le schéma MLSA détaillé en 2.6.

Une subdivision supplémentaire s'est appuyée sur la diversité des séquences de l'endoglucanase (*egl*) : les séquévars (Fegan & Prior 2005) rassemblent des souches dont les séquences partielles *egl* sont divergentes de 1% au plus. Ces groupes (53 à l'heure actuelle) étaient originellement bien corrélés avec les caractéristiques écologiques des souches, mais la disponibilité de séquences beaucoup plus nombreuses a remis en cause cette corrélation, et mis en évidence les limites de ce seuil arbitraire de 1% de dissimilarité.

Enfin, les travaux de génomique comparative du groupe Prior (Ailloud 2015, Remenant et al. 2010, Remenant et al. 2011) ont amené à proposer une subdivision de *R.solanacearum* en 3 espèces génomiques (*R.sequeirae*, *R.solanacearum*, *R.haywardii*) ; cette subdivision en 3 espèces a aussi été proposée suite à des travaux de taxonomie polyphasique bactérienne classique (Safni et al. 2014).

L'existence de ces trois espèces génomiques est largement débattue dans la communauté scientifique, notamment au vu des échanges génétiques identifiés entre phylotypes (détaillés en 2.6.).

Les différentes classifications intraspécifiques sont synthétisées sur la figure 4.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------------------|----|----|----|-----|----|----|----|-----------------------|----|----|---|------|------|---|----|--------------------|-----|-----|----|----|----|--|--|--|--|--|--|
| Complexe d'espèces | <i>Ralstonia solanacearum</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Espèce génomique (Remenant 2010, 2011) | <i>R.sequeirae</i> | | | | | | | | <i>R.solanacearum</i> | | | | | | | | <i>R.haywardii</i> | | | | | | | | | | | |
| Phylotype | I | | | | III | | | | IIA | | | | IIB | | | | IV | | | | | | | | | | | |
| Clade | 1 | | | | 6 | | | | 2 | | 3 | 4 | | 5 | | ND | 7 | | 8 | ND | | | | | | | | |
| Sequevars basés sur <i>Egl</i> | 13 | 30 | 44 | 16 | 12 | 19 | 42 | 29 | 6 | 5 | 39 | 7 | 4A | 4NPB | 1 | 3 | 25 | 28 | 8 | 10 | 9a | 11 | | | | | | |
| | 14 | 31 | 45 | | | 20 | 43 | | | 35 | 41 | | 4SFR | 51 | | | 26 | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 32 | 46 | | | 21 | 44 | | | 36 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 17 | 33 | 47 | | | 22 | 48 | | | 37 | 52 | | | 2 | | | 27 | | | | 9b | | | | | | | |
| | 18 | 34 | 48 | | | 23 | 49 | | | 38 | 53 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Biovar | 3 | | | 4 | 5 | 1 | 2T | 1 | | | | 1 | 1 | 2 | 1 | 2T | 2T | BDB | RSY | 2 | | | | | | | | |
| Race | 1 | | 4 | 5 | | | | | 2 | 1 | | 2 | | 3 | 2 | | | | | | | | | | | | | |

Figure 4. Synthèse des différentes classifications de *Ralstonia solanacearum* en races, biovars (Buddenhagen et al. 1962, Hayward 1964), phylotypes et séquevars (Fegan and Prior 2005), clades (Wicker et al. 2012), espèces génomiques (Remenant et al. 2010, Remenant et al. 2011)

Une plasticité phénotypique importante, difficile à formaliser

Un écotype est défini comme un groupe bactérien partageant les mêmes caractères écologiques (Cohan 2006) : partageant le même hôte, la même symptomatologie, et induisant une maladie dans des conditions climatiques similaires.

Si la gamme d'hôte de *R.solanacearum* est très large, un certain nombre d'écotypes, définis d'après leurs caractéristiques écologiques communes, ont été identifiés (figure 5), parmi lesquels:

- L'écotype Moko, polyphylétique (« paraphylétique » selon (Albuquerque et al. 2014)), rassemble les souches capables d'infecter et faire flétrir les bananiers
- L'écotype « brown rot » est caractérisé par une préférence d'hôte sur tomate et pomme de terre, et surtout l'aptitude à induire une maladie à température fraîche (18-24°C) (Milling et al. 2009) ; il est positionné dans le phylotype IIB et séquevar 1 (« American Brown Rot ») mais aussi dans le phylotype III (« African brown rot »)
- L'écotype « émergent » possède un spectre de virulence englobant Solanacées, mais aussi Aracées et Cucurbitacées ; sa description est détaillée plus bas (partie 2.3.)

| Phylotype | Origine | Clade | Ecotypes | | |
|------------------|-----------|-------|--|-----------|----------|
| I | Asie | 1 | Flétrissement bactérien | Ginger | Mulberry |
| IIA | Ameriques | 2 | Flétrissement bactérien (BW) | Moko | |
| IIA ^T | | 3 | | | |
| IIB | Ameriques | 4 | "Emergent" NPB | Moko | |
| | | 5 | BW tomate et geranium | Brown Rot | Moko |
| III | Afrique | 6 | Flétrissement bactérien | Brown Rot | |
| IV | Indonesie | 7 | Flétrissement bactérien | BDB | |
| | | 8 | R.syzygii,maladie de Sumatra sur giroflier | | |

Figure 5. Les écotypes de *R.solanacearum* et leur positionnement phylogénétique (d'après Genin & Denny (2012)). Les écotypes « ginger » et « mulberry » infectent respectivement le gingembre et le mûrier.

Conséquences pour la lutte intégrée contre *R.solanacearum*

L'exceptionnelle plasticité génomique et phénotypique de cette bactérie rend particulièrement difficile la généralisation de méthodes de lutte existantes (variétés résistantes, rotations culturales), et notamment l'utilisation de ressources génétiques mondiales disponibles pour exploiter les propriétés de résistance et/ou de tolérance. En 1995, des essais variétaux multilocaux ont été effectués dans 12 pays sur une collection de 35 lignées de tomate (Wang et al. 1998). Ils ont confirmé la forte interaction plante-pathogène-environnement, traduisant un fort effet du milieu mais aussi des populations pathogènes locales, les souches les plus virulentes à l'époque étant repérées au Japon et à Taiwan.

Plus récemment, (Wang et al. 2000) ont montré que la résistance de Hawaii 7996 - l'une des accessions les plus résistantes chez la tomate et considérée comme la plus stable au monde - était contrôlée par un locus souche-spécifique. Cette variété est déclarée très sensible à certains isolats Taiwanais (Jaunet and Wang 1999). Dans le cas du piment, des auteurs Brésiliens ont mis en évidence des comportement de résistance biovar-spécifique vis-à-vis de

souches locales de *R. solanacearum* (Lopes et al. 2006). Ces quelques données montrent l'impérieuse nécessité de caractériser plus finement les interactions souche-cultivar, pour les modèles tomate, poivron et aubergine.

4 Emerging from the wild: l'écotype émergent de Martinique - Facteurs écologiques de l'émergence en Martinique de la lignée IIB/4NPB

Depuis sa première description aux Antilles françaises (Digat 1967), *Ralstonia solanacearum* était connu pour n'attaquer que les Solanacées (tomate, aubergine, poivron, pomme de terre ponctuellement). La présence très ancienne de maladie de Moko dans le Sud de l'arc Antillais (Trinidad) ainsi que la description d'épidémies dévastatrices dans les bananeraies de l'île de Grenade à partir de 1978 (Ambrose 1987), incitait à la vigilance dans des îles où l'agro-industrie bananière occupe une place économique primordiale. Une caractérisation biochimique menée à la fin des années 1980 avait montré que les populations de Guadeloupe et de Martinique étaient composées en majorité de souches de biovar 3 (phylotype I), avec une minorité de biovar 1 (phylotype II), uniquement pathogènes sur Solanacées. Aucune souche provoquant la maladie de Moko n'avait été détectée (Prior and Steva 1990).

A partir de 1999, *R. solanacearum* a été mis en évidence sur des plants d'anthurium dépérissant en Martinique, trouvés dans les zones forestières humides de l'intérieur de l'île. Les foyers de maladie évoluaient très rapidement, commençant par un jaunissement des feuilles, une nécrose foliaire, un pourrissement du rhizome avec exsudation bactérienne, et pouvant aller jusqu'à la mort de la plante. Fin 2001, des flétrissements observés sur melon, dans des zones récemment défrichées du Sud Atlantique, sont attribués à *R. solanacearum* ; en 2002-2003, concombre, giraumon, courgette, puis pastèque sont à leur tour attaqués. Les souches provoquant ces nouveaux cas sont du même groupe génotypique que les souches isolées sur anthurium : phylotype II, sequevar 4 NPB (Non-Pathogène sur Bananier) (Fegan and Prior 2002, Prior and Fegan 2002, Wicker et al. 2002).

De ce contexte ont émergé trois grandes questions de recherche :

- (i) Ces nouvelles souches constituent-elles une lignée évolutive homogène ?
- (ii) Est-on en face d'une réelle émergence ?
- (iii) Quels sont les facteurs écologiques qui ont pu expliquer cette émergence ?

Grâce à la collaboration fructueuse que j'avais montée avec les différents acteurs de terrain en Martinique (Service de Protection des Végétaux, FREDON, Chambre d'Agriculture,

Coopérative SOCOPMA) et l'INRA d'Avignon (P. Prior), nous avons pu mener une prospection très poussée sur les 4 zones pédo-climatiques de la Martinique, en visitant une centaine d'exploitations maraîchères, ornementales, bananières.

4.1 Les souches « IIB/4NPB » sont monophylétiques, et constituent un écotype distinct

Le typage PCR-spécifique a été mené par (i) une multiplex-PCR ciblant l'ITS, permettant de déterminer le phylotype (Fegan and Prior 2005), et (ii) une multiplex-PCR « musa » ciblant plusieurs fragments spécifiques des souches Moko (Prior and Fegan 2005). L'analyse phylogénétique de séquences partielles des gènes de l'endoglucanase (*egl*) et de l'enzyme de réparation des mésappariements (*mutS*) a permis d'établir très clairement que les souches typées II/4NPB en multiplex-PCR « Musa » constituent un Séquencotype unique, partagé avec les souches Moko de séquévar 4 (Wicker et al. 2007).

Cette nouvelle population, appelée « population émergente », a été préférentiellement isolée d'anthurium et de Cucurbitacées, et présente une gamme d'hôte assez unique d'après nos tests expérimentaux (Wicker et al. 2002). Outre les Solanacées (tomate, aubergine, piment), ce groupe attaque également les principales Cucurbitacées cultivées (melon, giraumon [potiron antillais], concombre, pastèque, courgette), les Aracées anthuriums (*Anthurium andreanum* et *A. ferrierense*), et le balisier (*Heliconia caribea*, une Musacée). Surtout, ces souches n'infectent pas le bananier Dessert (génom AAA), mais sont spécifiquement capables d'infecter et se vasculariser dans le pseudotrunc de bananier-plantain (AAB). Il apparaît donc que la Martinique héberge deux populations :

- une population « historique », implantée au moins depuis les années 1980 puisque décrite par (Prior and Steva 1990, Prior et al. 1990), constituée de phylotype I et phylotype IIA, et inféodée aux Solanacées.
- une population nouvelle, apparue en 1998, à base génétique très étroite (phylotype IIB, sequevar 4 -NPB), à la gamme d'hôte complètement nouvelle englobant l'anthurium et les Cucurbitacées. Cette lignée est phylogénétiquement positionnée dans une branche « Moko » du phylotype IIB, tout en étant non-pathogène sur bananier.

4.1.1 Un spectre de virulence inattendu sur tomate

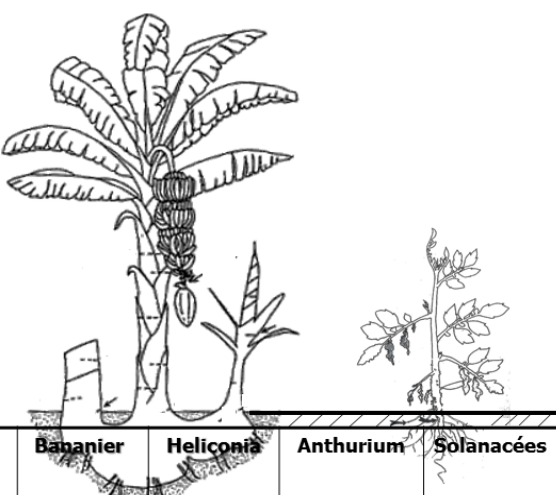
Au début des années 2000, les trois principales sources de résistance au flétrissement bactérien chez la tomate étaient représentées par (i) Hawaii7996 and Hawaii7997, (ii) CRA66, and (iii) TML114 (Hanson et al. 1998). Des inoculations contrôlées ont permis d'établir que les souches 4NPB étaient virulentes et hautement agressives sur ces 3 sources

(Wicker et al. 2009). Sur Hawaii 7996 en particulier, qui reste l'accension résistante de référence, les incidences de flétrissement atteignaient 53%.

L'étude du spectre de virulence de ces souches sur Solanacées a été par la suite intégrée dans la thèse d'Aurore Lebeau à la Réunion (Lebeau 2010, Lebeau et al. 2011), détaillée plus loin. Ce spectre est exceptionnel : les IIB-4NPB sont en effet virulentes et très agressives sur toutes les références résistantes de piment et de tomate, et ne sont contrôlées que par les aubergines SM6, Surya et AG9101 (respectivement codées E2, E4, E5)(Lebeau et al. 2011). Ces souches sont par ailleurs capables de flétrir les tomates, les aubergines et les piments, non seulement aux températures tropicales de plaine (25-30°C) mais aussi en conditions « fraîches » (18-24°C) (Lebeau et al. 2011), alors que les températures de leur environnement d'origine ne descendent jamais sous les 21°C.

4.1.2 Le groupe « IIB/4NPB » remet en cause la dichotomie Souches « Moko »/souches « Flétrissement bactérien »

Depuis les travaux de Sequeira et de Buddenhagen, la vision communément admise par la communauté scientifique distinguait des souches « Moko »(ex-race 2/biovar 1) très spécialisées sur Musacées, et des souches « flétrissement bactérien » relativement polyphages mais non pathogènes sur Musacées (appelés primitivement souches « T » (tomato) (Sequeira and Averre 1961)). Les souches 4NPB bouleversent cette classification (Figure 6).



| ECOTYPE (Phyl/ sequevar) | Bananier | Heliconia | Anthurium | Solanacées | Cucurbits |
|--------------------------------|--------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| H (II/3) | (+) | + | ? | ? | ? |
| D (II/3 et 4) | (+) | + | ? | - | ? |
| SFR, B, A (II/4 et 6) | + à ++ | + | ? | - | ? |
| T (I, II/5) | - | - | ? | ++ | ? |
| II/4NPB | AAA:- ? AAB:(+) | + | + | + | + |

Figure 6. Le groupe II/4NPB bouscule la classification des écotypes Moko, établis d'après leur morphologie, leur pouvoir pathogène, leur écologie dans le sol et insectes (Thwaites et al. 2000). Les correspondances phylotype-sequevars /écotypes ont été établies d'après (Fegan and Prior 2006, Prior and Fegan 2005).

Il restait une question à résoudre : ce nouveau « variant pathogène » constituait-il vraiment une population émergente ?

4.2 Facteurs écologiques de l'émergence

Les infections ou maladies émergentes ont été définies comme des maladies apparaissant dans la population pour la première fois, ou qui existaient préalablement mais ont rapidement augmenté en incidence ou en répartition géographique (Morse 1995). Nos données d'épidémiosurveillance relevées depuis 1999, de deux enquêtes en 2000-2001, et d'une grande enquête-prospection de 5 mois (Septembre 2002-Janvier 2003) où les échantillonnages englobaient espèces hôtes connues mais aussi adventices et espèces sauvages en fonction de l'historique parcellaire, ont permis d'établir clairement que l'apparition des souches IIB/4NPB constituait une véritable émergence :

⇒ Par l'acquisition de nouveaux hôtes et l'établissement dans l'environnement

Initialement isolées sur anthurium, les IIB-4NPB sont ensuite retrouvées fréquemment sur Solanacées. Les fréquences d'isolement sur Solanacées et les périodes d'isolement étaient significativement associées (χ^2 test, $P < 0.001$), suggérant que les IIB-4NPB ont étendu leur gamme d'hôte de Anthurium-Cucurbitacées (1999-2002) à Anthurium-Solanaceae-Cucurbitaceae (2002-03). La fréquence des IIB-4NPB parmi les souches isolées de Solanacées augmente d'ailleurs rapidement de 1999 à 2003, pour atteindre près de 30%. Par ailleurs, ces souches se sont rapidement établies dans l'environnement, comme l'attestent les isollements sur adventices et dans l'eau de rivière. Sur un total de 466 échantillons couvrant 82 espèces, *R.solanacearum* a été isolé de 18 espèces, dont 10 sont infectées par les IIB/4NPB : principalement des Aracées (*Xanthosoma* sp.), Heliconiacées (*Heliconia caribea*), Solanacées (*Solanum americanum*). Ces souches sont également détectées dans la Rivière Lézarde, au captage de « Deux-Terres » qui alimente le lac de la Manzo (11.76% de IIB-4NPB détectées, $n=34$), mais aussi dans le lac de la Manzo lui-même (1% détecté, $n=497$), qui irrigue tout le Sud-Est de l'île (Figure 7).

⇒ Par une propagation rapide du Nord vers le Sud

Seules 4 des 34 communes de Martinique n'ont pas été échantillonnées. L'épidémie a commencé en 1998 sur les hauteurs de Fort-de-France, puis s'est étendu dans le Nord,

essentiellement sur anthurium. Les premiers cas de flétrissement sur giraumon apparaissent ensuite dans le Sud, au Vauclin, en 2002. En 2003, les souches IIB-4NPB ont envahi l'ensemble de l'île (Figure 7), probablement suite à la contamination du lac de retenue de la Manzo.

Le génotypage des populations par REP-PCR (Neretti 2008) a permis de confirmer partiellement cette hypothèse, en montrant la forte similarité génotypique entre populations du Centre (Ducos) et du Sud (St esprit/Vauclin). Cependant la diversité génotypique est très largement distribuée dans les zones pédo-climatiques (90.22% de la variance), indiquant que la différenciation entre régions est faible.

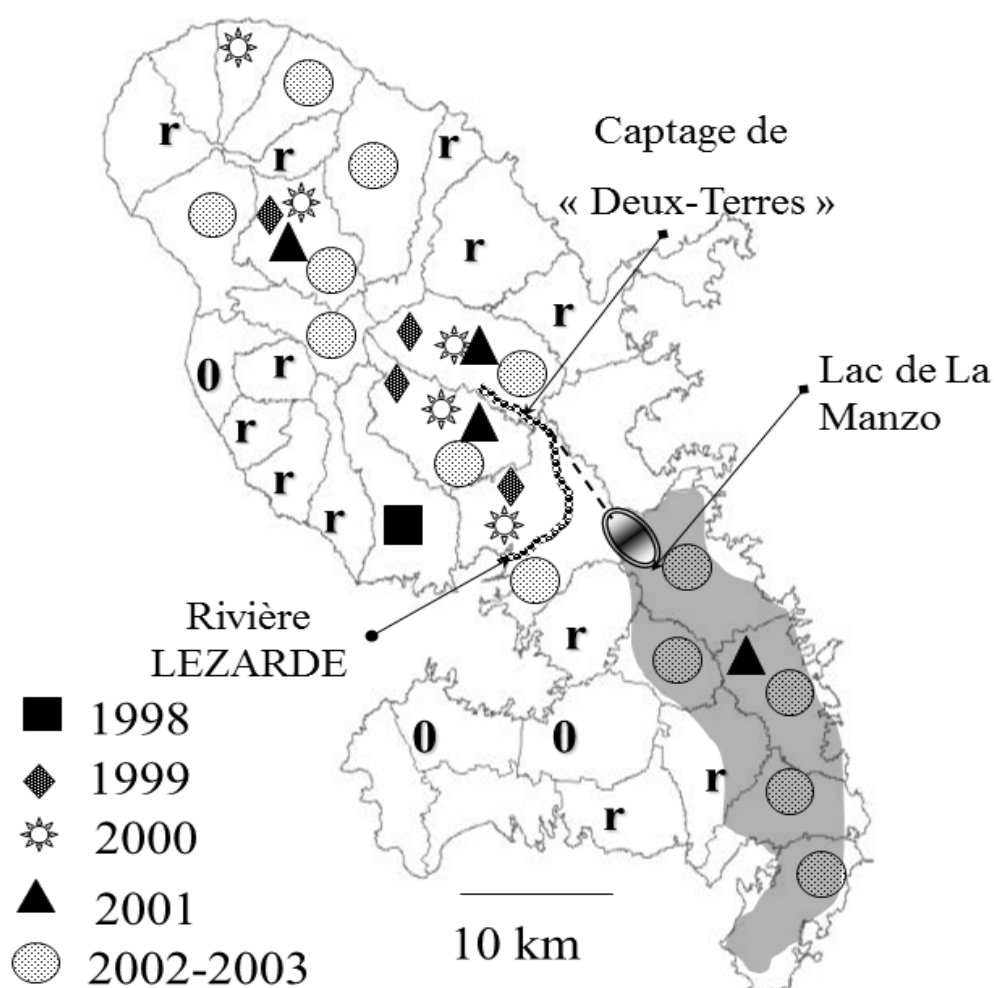


Figure 7. Les souches IIB-4NPB ont envahi la Martinique en 5 ans. Carte de prévalence dans les 34 communes de 1998 à 2003. r : communes échantillonnées, d'où aucun IIB-4NPB n'a été isolé ; 0 : communes échantillonnées, d'où aucun *R.solanacearum* n'a été isolé. La zone grisée correspond aux surfaces irriguées par le lac de la Manzo

⇒ Favorisée par les rotations bananier/maraîchage ?

La comparaison des fréquences I/IIA/IIB-4NPB dans les 4 zones pédoclimatiques a souligné une surreprésentation significative des IIB-4NPB dans le Nord-Atlantique, seule zone de l'île où les rotations bananier-maraîchage sont pratiquées couramment. Nous avons donc considéré un sous-échantillon de 37 parcelles de tomate, pour évaluer l'effet du précédent cultural sur les phylotypes infectant un même hôte, la tomate. Globalement cet effet est significatif (test χ^2 , $P = 0.006$). Après une Solanacée, seuls les phylotype I et IIA étaient isolés. Après une culture de bananier, seules des IIB-4NPB étaient isolées de tomate.

Par la suite, les souches IIB-4NPB ont été désignées sous le terme d'« écotype émergent ».

La question de son caractère endémique ou introduit n'a pas été tranchée, mais a été abordée lors d'une étude d'épidémiosurveillance à l'échelle de la Caraïbe.

Après cette caractérisation d'épidémie, le programme a été orienté vers la recherche de stratégies de lutte adaptées, incluant les rotations assainissantes et la résistance variétale. Dans le but d'évaluer l'efficacité de ces méthodes de lutte, la mise au point d'une méthode fiable de suivi de la population dans le sol a mobilisé plusieurs étudiants ; cette thématique ne sera pas détaillée ici.

4.3 Une menace latente pour la Caraïbe et l'Amérique du Sud

L'écotype émergent a envahi la Martinique en seulement 5 ans, mais la question reste ouverte sur sa prévalence en Caraïbes et Amérique du Sud. Des souches semblables avaient été interceptées sur *Pothos* originaire du Costa-Rica (Norman et al. 2009), mais il s'est avéré que leur positionnement était dans le phylotype IIB-sequevar 4SFR (données non publiées 2011). L'identification formelle de souches IIB-4NPB dans une collection Brésilienne isolée de Cucurbitacées en 1999, ainsi que sur des plants d'*anthurium* malade à Trinidad (Wicker et al. 2007), suggère qu'il est en fait présent en Amérique du Sud à l'état latent. Nous avons exploré cette question en Caraïbes à l'occasion de la thèse d'A. MUHAMAD, co-dirigée avec le Prof. Adesh RAMSUBHAG (University of West Indies, St Augustine, Trinidad). Nous avons également caractérisé l'émergence de ce nouvel écotype en Guyane française à partir de 2006, grâce à une collaboration entre UMR PVBMT et UR Hortsys, et plusieurs acteurs de la filière maraîchère Guyanaise.

4.3.1 Epidémiosurveillance Caraïbes

Cette campagne d'échantillonnage répondait à deux enjeux principaux pour la sécurité alimentaire de cette région. Premièrement, la bananeraie de ces petites îles était sous la menace grandissante de la maladie de Moko. Primitivement décrite à Trinidad (Rorer 1911), cette maladie n'avait été décrite ensuite que sur le continent Sud-Américain - Guyana, Venezuela, Costa-Rica, Honduras et Panama en 1960, puis Salvador, Guatemala, Mexique, Colombie Pérou et Brésil en 1972 (Frossard 1987). A partir de 1979, une terrible épidémie décime la bananeraie de l'île de Grenade (Ambrose 1987), provoquée par la souche SFR (donc très probablement IIB-sequevar 4 ou IIA-sequevar 6). La maladie est ensuite signalée en Jamaïque à partir de 2004, puis Saint-Vincent en 2007 (EPPO 2015). La dernière étude de diversité moléculaire en date (Das et al. 2006) indiquait une présence de sequevar 3 et 4 au Costa-Rica, de sequevar 3 et 6 au Honduras, de sequevar 4 en Colombie, Pérou, Cuba ; de sequevar 6 au Venezuela et Guyana. Il devenait donc urgent de mieux connaître les populations pathogènes en présence, avant d'éventuellement reconstruire les routes de dissémination. Le deuxième enjeu concernait le contrôle du flétrissement bactérien en cultures maraîchères, et l'émergence des souches IIB-4NPB en Martinique poussait à anticiper la possible manifestation de cet écotype dans l'ensemble de l'arc Caribéen. Compte-tenu de l'ampleur du projet, nous avons limité nos ambitions aux pays du Sud-Est Caribéen ayant des relations commerciales régulières avec Trinidad ou les Antilles françaises.

Des campagnes de prospection en cultures maraîchères et bananières ont donc été engagées durant la thèse d'Amaala MUHAMAD dans les îles de Trinidad, Grenade, Saint-Vincent, Guadeloupe (collaboration avec l'INRA Guadeloupe), en Jamaïque , et au Guyana, pays où fut décrit la maladie de Moko en 1840 (Sequeira 1998).

Maladie de Moko : îles voisines mais populations différentes

L'effort d'échantillonnage a été malheureusement insuffisant pour avoir une cartographie précise des différentes populations en présence sur chaque île, mis à part sur St Vincent et Grenade. Le génotypage par séquençage des gènes *egl* et *mutS* a révélé que la plupart des cas de Moko échantillonnés dans la zone (Guyana, Grenade, Venezuela, Honduras) étaient provoqués par des souches de IIA-sequevar 6, qui constituent un Séquençotype (ST) unique en *egl* et *mutS* (eST001/mST001) ; ce point est à rapprocher de la situation au Guatemala (Sanchez Perez et al. 2008). L'unique souche ramenée de Jamaïque (IMI391743) est également IIA-6. En revanche, la composition des populations Moko de Saint-Vincent est très

différente, avec une majorité (85%, n=20) de IIB-sequevar 4 dans un unique ST (eST016/mST003), tandis que seules 2 souches (10%) de IIA-sequevar 6 sont isolées. Cette situation contraste donc fortement avec la Grenade où une prospection plus étoffée (62 souches) a conclu à la présence exclusive de IIA-sequevar 6. Il apparaît donc très improbable que la maladie de Moko ait été introduite à St Vincent depuis la Grenade. Une introduction depuis la Colombie voisine serait par contre envisageable, compte-tenu des nombreux échanges incontrôlés entre ces deux pays. Le sequevar 4 MOKO a été récemment identifié sur des adventices prélevées en bananeraie dans la région d'Uraba, sur la côte caribéenne de la Colombie (Cardozo et al. 2009, Cardozo et al. 2010). Il n'a cependant pas été possible de partager des souches Colombiennes avec les équipes du pays.

L'écotype émergent n'a pas été détecté en dehors de Martinique

Les prospections organisées en Guadeloupe (2007), St Vincent, Trinidad, Guyana (2008) sur cultures maraîchères ont permis d'établir, au biais d'échantillonnage près, que les populations causant le flétrissement bactérien appartiennent au phylotype I (sequevar 14, 18, 46) et IIA-clade 2 (sequevars 35, 36, 38, 39, 41, 54), avec la présence de IIA-clade 3-sequevar 7 à Trinidad (Ramsubhag et al. 2012), tandis que l'écotype émergent n'est pas présent ou pas détectable en plein champ.

Cette étude a le mérite de mettre à jour les connaissances sur les souches circulant dans la zone Caraïbe, alors que les derniers relevés officiels EPPO oscillent entre 1988 et 1998 (EPPO 2015). Elle va faire l'objet d'une Short Note dans la revue Plant Disease.

4.3.2 Emergence en Guyane française

Le cas de la Guyane française était particulièrement intéressant car la présence de maladie de Moko y avait été signalée dès 1962 dans la région de Cayenne, puis sporadiquement dans les années 2000. Les premières épidémies de flétrissement bactérien sur tomate et piment y ont été décrites dès 1967 (le premier génome séquencé chez *R. solanacearum* fut extrait d'une souche de Guyane, GMI1000 (Salanoubat et al. 2002)), mais les premiers cas d'infection par les IIB-4NPB n'apparurent qu'en 2006, dans la région littorale de Macouria. Une prospection réalisée en 2 campagnes (2011-2012) a donc ciblé les trois principales zones maraîchères guyanaises (zones agro-écologiques), avec une méthodologie d'échantillonnage similaire à celle utilisée en Martinique.

Sur une collection de 239 souches isolées de 25 exploitations, il est ainsi apparu que l'écotype émergent était présent dans chacune des trois zones et 13 des 25 sites, avec des fréquences

oscillant entre 20 et 30% des souches, essentiellement isolé de Solanacées mais aussi Cucurbitacées (*Cucurbita pepo*). Les souches émergentes de Guyane présentent une spécificité d'hôte (Solanacées et Cucurbitacées) et un spectre de virulence sur Solanacées similaire à celles décrites en Martinique. Virulentes et agressives sur la tomate résistante Hawaii 7996, elles sont en revanche contrôlées par les aubergines SM6 et Surya (E2 et E4 *sensu* Lebeau et al. (2011)).

Ici encore, nous avons pu démontrer que le précédent cultural avait un effet statistiquement significatif sur la composition phylogénétique des populations. En Guyane, l'écotype émergent semblait favorisé par les précédents «Chou» et «Cucurbitacées» (Test Chi-2, $P= 2.35 \times 10^{-7}$ et 9.50×10^{-4} respectivement), tandis que les phylotype IIA étaient favorisés par les précédents «laitue» et «forêt» ($P= 1.05 \times 10^{-8}$ et 4.68×10^{-3} respectivement) et le phylotype I par le précédent «jachère» ($P= 9.96 \times 10^{-7}$).

Surtout, nous avons eu la preuve que *R. solanacearum* était capable de s'établir dans le compartiment sauvage : des cas de flétrissement de solanacées en première culture ont été enregistrés dans les trois zones agro-écologiques, et les parcelles nouvellement défrichées hébergeaient la plus grande diversité en groupes phylogénétiques (phylotype I, IIA, IIB-4NPB, IIB-27). Il reste à présent à approfondir les connaissances sur l'écologie de *R. solanacearum* dans le compartiment sauvage, notamment en identifiant ses hôtes alternatifs (Aracées comme en Martinique ? Musacées ornementales comme en Amérique centrale ?).

Enfin, cette prospection a permis de mettre à jour les connaissances sur la diversité phylogénétique dans cette région du Monde, et de mettre en exergue l'originalité des populations Guyanaises de *R. solanacearum*. Dans le phylotype I, la Guyane héberge 4 séquevars, dont un (seq47) était jusque-là connu uniquement en Indonésie et Thaïlande. Dans le phylotype IIA, quatre séquevars ont été trouvés dont un (seq41) était uniquement connu au Cameroun. Dans le phylotype IIB, deux séquevars ont été trouvés : dans le séquevar 4NPB, a été identifié un nouveau ST, tandis que le séquevar 27 avait été décrit jusque-là uniquement au Pérou comme écotipe «Brown Rot».

4.4 D'où vient cet écotipe émergent ?

La question qui demeure après ces travaux concerne l'origine de cet écotipe émergent IIB-4NPB, et de sa parenté évolutive avec l'écotype Moko du clade 4 (qui est à l'origine de qui ?). Il pourrait être apparu dans le Bassin Amazonien, et de là avoir été disséminé dans la Caraïbe

(Figure 8). Mais cette hypothèse doit être validée par des prospections supplémentaires en Amérique du Sud, notamment au Venezuela, en Colombie, au Brésil.

Pour reconstituer les parentés évolutives entre populations de Martinique et populations de Guyane, nous avons séquencé 6 gènes de ménage et amplifié 11 loci « Variable-Number of Tandem repeats » (VNTR, décrits en 2.7.1.3) sur différentes populations et souches de référence du clade 4 (rassemblant l'écotype émergent 4NPB et les souches Moko du clade 4/sequevar 4). Les analyses sont encore en cours ; les résultats préliminaires mettent en évidence une plus grande diversité haplotypique en Guyane (22 haplotypes MLVA sur les 37 observés) qu'en Martinique ; il reste cependant à comparer les richesses alléliques totales et privées dans les différentes localités.

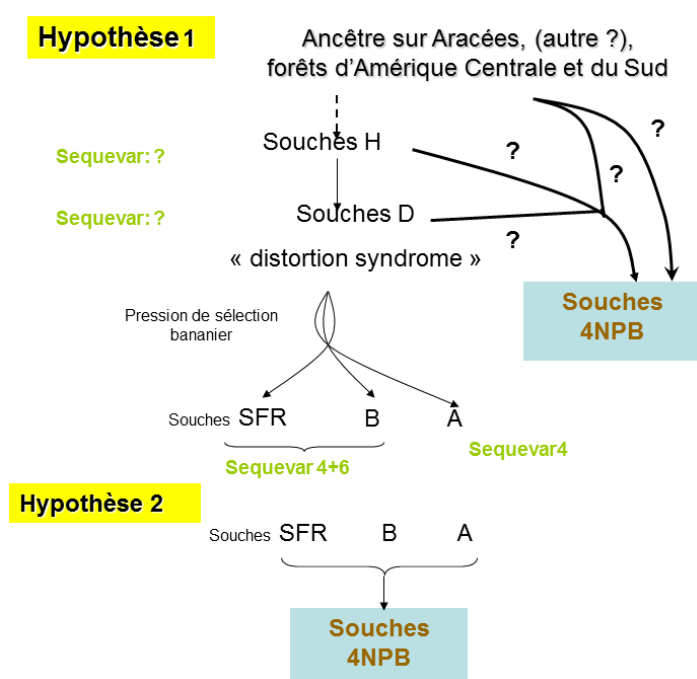


Figure 8. Hypothèses de spéciation des souches Moko, inspirées de (Fegan 2005, French and Sequeira 1970, Sequeira and Averre 1961).

Hypothèse 1 : L'ancêtre commun de ces souches se maintiendrait sur Aracées et/ou Heliconiacées dans les forêts d'Amérique centrale et du Sud et aurait donné les écotypes (i) H spécialisé sur Heliconia et faiblement pathogène sur bananier, (ii) D, spécialisé sur Musacées, provoquant une distorsion du régime de bananier sans flétrissement (iii) 4NPB, non pathogène sur bananier mais polyphage. Le défrichage des forêts vierges et le retour fréquent du

bananier aurait sélectionné des variants ayant acquis des facteurs de virulence leur permettant de faire flétrir le bananier (A, B, SFR) et d'être transmises par insectes (SFR). **Hypothèse 2 :** Les souches 4NPB seraient des souches Moko du séquévar 4 ayant perdu l'aptitude à flétrir le bananier, mais qui auraient acquis l'aptitude à coloniser et flétrir les Solanacées, Aracées, Cucurbitacées. Ces hypothèses sont à tester sur des situations où écototype Moko et écototype émergent sont en sympatrie (Colombie par exemple).

Ces travaux d'épidémiologie ont fait l'objet de trois stages Master (E. NERETTI, 2008 ; Manuella NORESKAL, 2011 ; Julie LAUNAY, 2012) et deux BTS et un DUT (Gaël MIREDDIN, 2003; Sébastien CADASSE, 2006 ; Pierre RIVIERE, 2012) et donné lieu à 3 articles de rang A et 1 article de congrès.

Ils ont permis de rapatrier plus de 300 souches dans la collection RUN, qui ont ensuite été valorisées dans différents travaux de génomique comparative menée par l'équipe de P. Prior (Ailloud 2015, Ailloud et al. 2015, Cellier et al. 2015).

Wicker E., Grassart L., Coranson Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Fegan M., Prior P.

2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and environmental microbiology*, **73** (21) : 6790-6801. [IF: 4.004 ; NC : 47]

Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu R., Mian D., Prior P. 2009. Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant pathology*, **58** (5) : 853-861. [IF: 2.368; NC : 12]

Wicker E., Coranson-Beaudu R., Cadasse S., William M.A. 2009. Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in the French West Indies raise new challenges to tomato breeders. In : Saygili H. (ed.), Sahin F. (ed.), Aysan Y. (ed.). *Proceedings of the second international symposium on tomato diseases. Acta Horticulturae* 808: 279-286.

Deberdt P., Guyot J., Coranson Beaudu R., Launay J., Noreksal M., Rivière P., Vigné F., Laplace D., Lebreton L., Wicker E. 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana Expands Knowledge of the "Emerging Ecotype". *Phytopathology*, **104** (6) : 586-596. [IF: 2.968 ; NC : 0]

5 Adaptation à l'hôte et durabilité de résistance - « Pathogen-informed strategies for durable resistance »

Quelques définitions (Zhan et al. 2015)

Infectivité : capacité d'une souche pathogène à causer une infection dans une plante portant un gène R (c'est aussi la virulence dans la littérature des phytopathologistes).

Agressivité : mesure quantitative du développement du pathogène (plutôt fongique), qui implique plusieurs traits, dont l'efficacité d'infection, la période de latence, la période infectieuse, la production de spores.

5.1 En quoi la biologie des populations peut-elle informer sur la durabilité de résistance ?

En milieu naturel, pathogènes et hôtes ont partagé une longue coévolution. La transition vers l'agriculture commencée il y a 12000 ans a bouleversé ces équilibres de population, avec le déploiement sur de grandes surfaces de populations hôtes très homogènes voire clonales, entraînant une pression de sélection très forte sur la population pathogène associée (Stukenbrock and McDonald 2008). Par ailleurs, le développement des échanges commerciaux entre pays ou continents a favorisé les migrations de matériel végétal mais aussi de leur cortège d'agents pathogènes. Lorsque ces migrations ont mis en contact des agents pathogènes sortis de leur aire d'origine avec des populations hôtes « naïves », l'établissement du nouveau pathogène a été très rapide, aboutissant à une émergence de maladie (Stukenbrock and McDonald 2008). La plupart des grandes épidémies connues dans les peuplements végétaux étaient dus à des pathogènes invasifs transportés hors de leur aire d'origine vers un nouvel environnement où ils ont été confrontés à une population hôte naïve, avec laquelle ils ne partageaient aucune histoire évolutive d'interaction (Zhan et al. 2015)

A cause de leur interdépendance, les pressions évolutives en action sur les populations hôtes et populations pathogènes sont couplées, et les changements évolutifs interviennent plus rapidement dans un écosystème agricole que dans un écosystème naturel. L'intégration des principes de la biologie évolutive en phytopathologie doit permettre de développer et optimiser des stratégies nouvelles intégrant l'utilisation de pesticides et de gènes de résistance.

5.1.1 Les modèles de co-évolution

La coévolution entre hôte et pathogène est visualisée comme une succession de pressions de sélection négatives réciproques appliquées par l'hôte et le pathogène (Figure 9) : le pathogène est sélectionné pour augmenter son infectivité, tandis que son hôte le contre-sélectionne en développant de nouveaux systèmes de reconnaissance et de défense. L'issue de l'interaction (maladie, ou résistance de l'hôte) dépend donc de l'intensité de sélection et des coûts respectifs de l'infectivité pour le pathogène (aussi nommé « coût de virulence ») et de la résistance pour l'hôte.

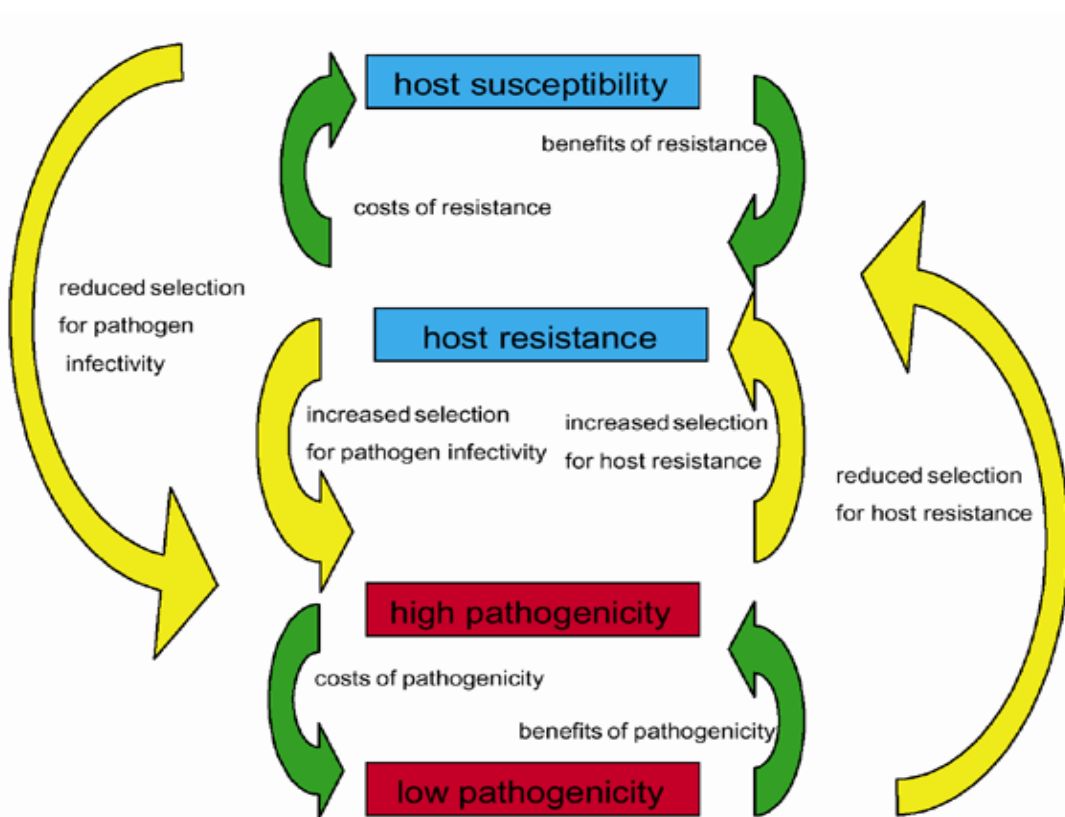


Figure 9. Coévolution hôte-pathogène, d'après Woolhouse et al.(2002)

Deux grandes hypothèses (figure 10) sont développées pour expliquer les trajectoires de coévolution (Terauchi and Yoshida 2010, Woolhouse et al. 2002):

- « La course aux armements » (sélection directionnelle). De nouveaux allèles de résistance et de nouveaux allèles d'infectivité se déploient respectivement dans les populations hôtes et pathogènes par un processus de balayage sélectif

séquentiel : à chaque nouvel allèle de Résistance de la plante rapidement déployé dans l'environnement, succède un nouvel allèle du pathogène lui donnant la capacité d'infecter le nouveau génotype d'hôte, qui envahit à son tour la population pathogène

- « la Reine Rouge » (sélection disruptive) est un processus à fréquence-dépendance négative, qui maintient les fréquences alléliques d'infectivité du pathogène et de résistance de l'hôte en fluctuation dynamique.

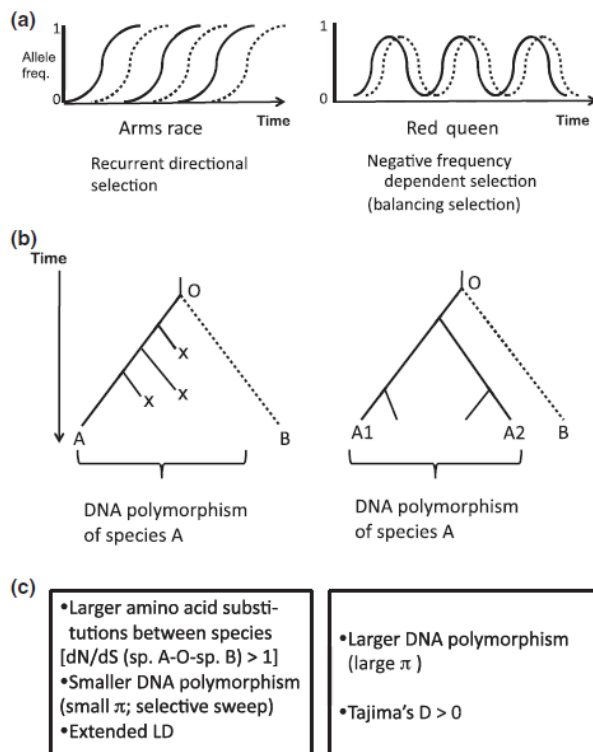


Figure 10. La course aux armements et la Reine Rouge, les deux scénarii évolutifs gouvernant les interactions hôtes-pathogènes, et leurs effets sur les polymorphismes ADN et la divergence (Terauchi & Yoshida, 2010).

(a) Modèles d'évolution des fréquences alléliques dans les interactions de type « course aux armements » (CAA, gauche) et « Reine Rouge » (RR, droite). (d'après Woolhouse et al., 2002). Lignes pleines : fréquences d'allèle d'effecteur du pathogène ; lignes pointillées : fréquences d'allèle de défense de l'hôte.

(b) Généalogies de gène d'un locus impliqué dans des interactions hôte-pathogène de type CAA (gauche) ou RR (droite). Les lignes pleines indiquent la généalogie intraspécifique, tandis que les lignes pointillées correspondent à une espèce apparentée. Dans le scénario CAA (gauche), un seul allèle (noté A) est sélectionné quand il confère une fitness supérieure à son organisme porteur. D'autres allèles sont contre-sélectionnés de la population (notés x). Dans le scénario RR (droite), deux ou plusieurs allèles (notés A1 et A2) sont maintenus dans l'espèce sur le long terme.

(c) Signatures moléculaires typiques résultant de CAA (gauche) et RR (droite).

Dans les agro-écosystèmes, c'est surtout le modèle de course aux armements qui est observé (déploiement d'un gène de résistance, forte sélection directionnelle, apparition de variants virulents jusqu'au contournement complet du gène de résistance). En revanche, l'hypothèse « Reine Rouge » est plus fréquente dans les interactions à long-terme en milieu naturel, comme démontré par exemple dans l'interaction *Pseudomonas syringae* /bactériophage (Zhan et al. 2015).

5.1.2 Le système immunitaire des plantes : du zig-zag à l'invasion

Originellement, les interactions plante-pathogène avaient été formalisées par le modèle « gène-pour gène » de Flor. En 2006, Jones et Dangl proposent un nouveau modèle qui révolutionne la vision que l'on avait de la résistance des plantes. Selon ce modèle, dit « en zig-zag » (Jones and Dangl 2006), les plantes possèdent un système immunitaire à deux niveaux de reconnaissance du non-soi : (i) une immunité déclenchée par des récepteurs membranaires (pattern-recognition receptors, PRR) reconnaissant spécifiquement des motifs moléculaires microbiens (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMP) ; ces MAMPs sont des motifs moléculaires conservés, essentiels à la physiologie du microorganisme (flagelline, facteur d'élongation EF-Tu, exopolysaccharides, peptidoglycane,...(Bittel and Robatzek 2007, Erbs and Newman 2012)). L'interaction MAMP-PRR déclenche des réactions de défense impliquées dans la « résistance basale », ou Immunité déclenchée par MAMPs (MTI), à large spectre. (ii) une immunité intra-cellulaire. Au cours de la coévolution, les pathogènes ont généré des protéines effectrices, injectées directement dans la cellule végétale, et capables de réprimer ces réactions de défense ou bloquer la reconnaissance des MAMPs (Effector-triggered Susceptibility, ETS). Ces effecteurs microbiens sont spécifiquement reconnus par des protéines végétales, entraînant la « réponse immunitaire-déclenchée- par effecteurs » (Effector-Triggered-Immunity, ETI). Cette ETI induit des réponses de défense beaucoup plus intenses, incluant la réaction hypersensible (HR), et à spectre d'action plus restreint. Au cours de la coévolution, les microorganismes synthétisent de nouveaux effecteurs capables de réprimer cette ETI.

Chez les bactéries phytopathogènes, le système de sécrétion de type III et ses protéines sécrétées (effecteurs de type III) constituent les facteurs essentiels impliqués dans ces interactions. L'essor de la génomique comparative a permis d'identifier de nombreux effecteurs chez les champignons (NPRS, PKS) et oomycètes (effecteurs RXLR et CRN chez *Phytophthora* et *Aphanomyces* (Gaulin et al. 2008, Stam et al. 2013, Vleeshouwers and Oliver 2014, Vleeshouwers et al. 2008)), qui perturbent les réactions de défense végétales.

Ce modèle implique donc l'existence d'effecteurs microbiens impliqués dans l'avirulence, i.e. reconnus par des gènes de plantes, et d'autres impliqués dans la virulence, i.e. contribuant à la capacité du microorganisme à infecter l'hôte et y induire des symptômes, mais non reconnus par des gènes R de plante, ou réprimant la réponse de défense induite par ces gènes R. Il implique également une dichotomie entre la MTI, extracellulaire, conservée et à spectre large, et la ETI intracellulaire, éphémère et souche-spécifique.

Cependant, plusieurs études récentes ont montré les limites de ce modèle. Certaines molécules ne cadrent pas avec le modèle, et notamment la dichotomie MAMP- effecteurs : les Nep1-like protéines (ou NLPs), encodées par bactéries, champignons et oomycètes, (Ottmann et al. 2009) servent simultanément des fonctions de virulence et contiennent des épitopes MAMP-like. Certains systèmes MAMP-PRR sont beaucoup plus dynamiques qu'attendu ; ainsi une région de la flagelline, distincte de la région flg-22, est sous sélection diversifiante chez *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pto) et joue un rôle de MAMP important (flgII-28) dans le pathosystème Pto/tomate (Cai et al. 2011). Des allèles de flagelline ont été identifiés dans des populations de *Xanthomonas euvesicatoria* et *Acidovorax avenae* qui atténuent la PTI (Vinatzer et al. 2014), signe que les MAMPs suivraient une dynamique évolutive proche de celle des effecteurs impliqués dans l'ETI.

Les travaux menés sur les adhésines et les senseurs des *Xanthomonas* (Mhedbi-Hajri et al. 2011) démontrent que ces molécules peuvent également être sous forte sélection adaptative, comme les effecteurs.

D'autre part, alors que les effecteurs étaient assignés à une unique fonction d'avirulence ou virulence, plusieurs exemples émergent d'effecteurs à rôle dual : *AvrPtoB* (effecteur de type III de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) est spécifiquement reconnu par le gène PTO (fonction d'avirulence) mais sa partie C-terminale est impliquée dans suppression de la HR (virulence) (Abramovitch and Martin 2005) ; de même AWR2 – ripA2 chez *R. solanacearum* (Sole et al. 2012), et AvrBsT chez *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Kim et al. 2010) ont un rôle dual dans la virulence et l'avirulence.

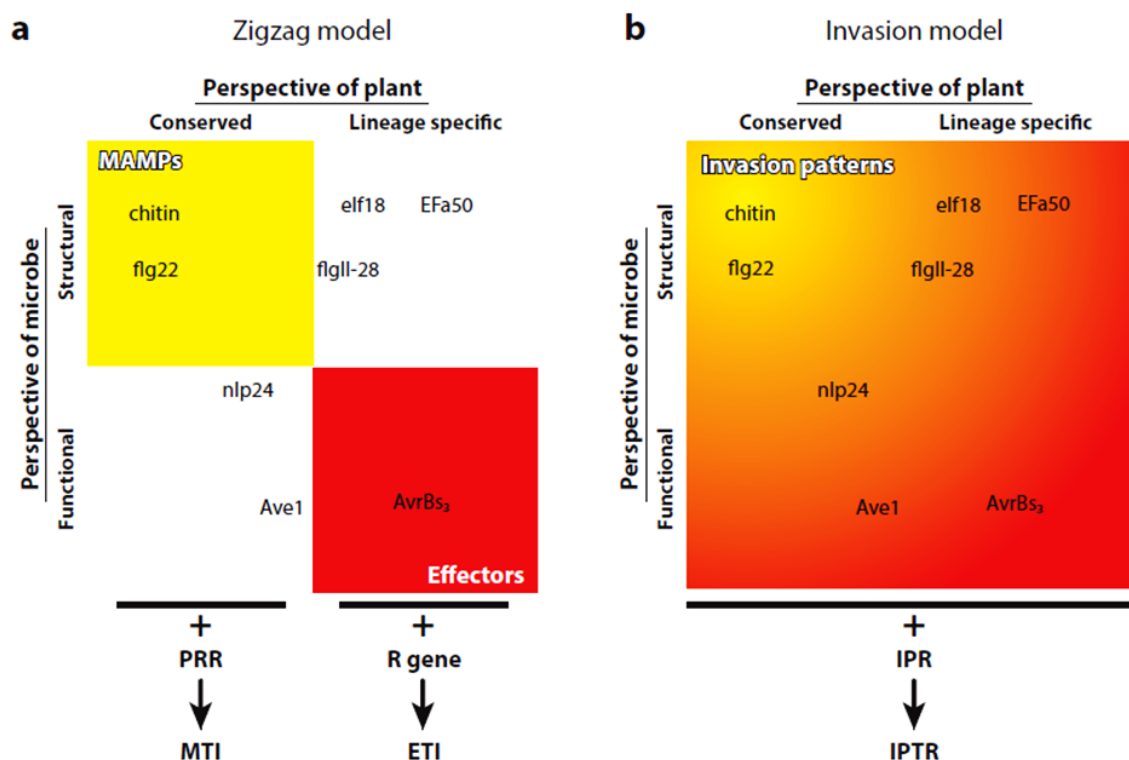


Figure 11. Comparaison des concepts sous-tendant les modèles « Zig-zag » et « Invasion ».

(a) Le **modèle en zig-zag** est conceptuellement défini en termes stricts : les plantes perçoivent soit des profils moléculaires microbiens (MAMPs; *boîte jaune*) par des récepteurs de reconnaissance (PRRs), menant à la réponse immunitaire-déclenchée-par-MAMP (MTI), soit des effecteurs (*boîte rouge*) grâce à des protéines R, menant à la réponse immunitaire-déclenchée-par-effecteur (ETI). Les axes de perspective plante (horizontal) ou microorganisme (vertical) indiquent les propriétés qui définissent communément ces termes. Certaines molécules (présentées en exemples sur la figure) défient la classification et tombent en dehors des boîtes colorées.

(b) Le **modèle d'invasion** est figuré de la même façon, excepté que l'espace définissant les molécules immunogènes est représenté comme un continuum, pour refléter l'idée que molécules et réponses occupent un spectre particulier en fonction de chaque catégorie définie. Les ligands sont appelés « profils d'invasion » (invasion patterns, IPs), qui sont perçus par des récepteurs végétaux d'IP (IPRs), menant à une ou des réponses déclenchée(s) par IP [IPTR(s)]. Les molécules immunogéniques sont placées sur les figures de façon à approcher leur localisation dans les espaces de la perception de la plante et la fonction microbienne.

Très récemment, Cook et al. (2015) ont proposé un nouveau « Modèle d'Invasion », qui transcende les limitations et manques du modèle en zig-zag, et considère toutes les interactions comme des symbioses, qu'elles soient mutualistes (rhizobactéries, mycorhizes) ou pathogènes.

Ce « Modèle d'invasion » considère le système immunitaire de la plante comme un système de surveillance évoluant pour détecter les invasions. Quatre principes fondamentaux le régissent :

- Les envahisseurs sont repérés d'après leurs MAMPs, mais aussi les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) et les effecteurs ;
- les symbiotes (mutualistes ou pathogènes) ayant réussi leur invasion ont évolué pour (i) éviter la détection de ligands par diversification de séquence ou modification post-traductionnelle, ou (ii) subvertir la réponse immunitaire de l'hôte grâce à des effecteurs biochimiquement actifs
- La coévolution est modelée par des récepteurs extra- et intra-cellulaires qui trahissent les envahisseurs
- Plusieurs interactions récepteur-ligand se mettent en place simultanément

Ce modèle dissocie notamment la fonction que la molécule peut avoir dans la physiologie du microorganisme, et ses capacités à être reconnue (ou à éviter la reconnaissance) par la plante.

5.1.3 Comment évaluer la durabilité de résistance ?

A l'origine, la durabilité de résistance était une notion mesurée rétrospectivement. Johnson définissait la résistance durable comme « une résistance qui reste efficace après déploiement sur de grandes surfaces de culture, sur un long pas de temps, et sous des environnements favorables au développement de maladie » (Johnson 1984, 1993). Selon le processus le plus connu, la résistance de l'hôte exerce une pression de sélection sur la population pathogène, induisant l'augmentation de fréquence des génotypes virulents, et rendant ainsi le cultivar résistant inefficace. Du coup, mesurer la durabilité ici revient à (i) mesurer le laps de temps entre l'introduction du cultivar résistant dans le système où le pathogène préexiste, et le moment où la fréquence du génotype pathogène virulent atteint un seuil au-delà duquel la résistance est considérée comme cassée, ou (ii) mesurer (dans le cas où le pathogène était absent du système) le laps de temps séparant l'introduction du génotype hôte résistant et l'apparition du génotype pathogène virulent par mutation ou immigration, qui s'installe ensuite en une population. Cette mesure est le temps estimé jusqu'à l'invasion de virulence (van den Bosch and Gilligan 2003).

5.1.3.1 Les contraintes évolutives sur les gènes d'avirulence seraient un bon estimateur de la durabilité

Les travaux fondateurs de l'équipe de J. Leach montrèrent que les gènes de résistance du riz qui induisaient la plus forte pénalité de fitness chez *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* étaient les plus durables. Ce qui indiquait que la pénalité de fitness imposée par la mutation ou perte du gène d'avirulence bactérien (« coût de virulence »), pourrait être un bon prédicteur de durabilité. Ce phénomène est aussi confirmé sur *Xanthomonas vesicatoria*.

Une étude menée sur 18 couples de gène de résistance/gène d'avirulence viral démontre une corrélation entre durabilité de résistance et le taux de sélection purificatrice portant sur les gènes Avr (Janzac et al. 2009).

5.1.3.2 Le potentiel évolutif du pathogène est un déterminant de durabilité

Les autres travaux fondateurs sont ceux de Mc Donald et Linde (2002), corrélant la durabilité de résistance observée sur 34 pathosystèmes au potentiel évolutif du pathogène, et définissant ce potentiel évolutif d'après sa structure génétique de population. Les pathogènes à potentiel évolutif le plus élevé possèderaient ainsi un taux de mutation élevé, une forte aptitude aux flux de gènes, une large taille efficace, un régime reproductif mixte (asexué et sexué).

5.1.3.3 Les propriétés de résistance déterminent la durabilité

La durabilité de résistance dépend aussi du niveau (résistance qualitative ou quantitative), du spectre d'action (souche-spécifique vs. large spectre), ainsi que du déterminisme génétique (monogénique vs. polygénique). Peu de données expérimentales expliquent pourquoi, chez un pathosystème particulier, certains cultivars résistants le restent durablement tandis que d'autres résistances cassent.

Deux hypothèses peuvent expliquer la plus forte durabilité de la résistance polygénique : (i) plus il y a de facteurs de résistance à casser, plus le nombre nécessaires de mutations ponctuelles pour y parvenir est grand, et moins probable est leur occurrence ; (ii) la pression de sélection due à des facteurs de résistance quantitative est moins forte que celle exercée par des gènes majeurs, et ne permet donc pas l'émergence de mutants virulents chez le pathogène.

Palloix et al. (2009) ont comparé la durabilité relative d'une résistance majeure monogénique à celui d'une résistance polygénique en conditions contrôlées, sur un

pathosystème (le Potato Virus Y sur Piment) qui permet l'analyse des changements génétiques intervenant chez le pathogène durant son adaptation. Ils montrent ainsi que le gène majeur de résistance *Pvr2³* est plus facilement contourné lorsqu'il est dans un fonds génétique sensible (i.e. pas de QTLs), alors que ce contournement ne se produit pas quand le gène majeur est introgressé dans un fonds partiellement résistant, qui empêcherait l'émergence de mutants viraux virulents. Par la suite il a été démontré que la présence d'un gène contrôlant l'accumulation du virus dans la plante améliore significativement la durabilité du gène majeur (Quenouille et al. 2014).

Des résultats similaires sont obtenus en conditions naturelles sur le pathosystème *Leptosphaeria maculans*/colza, démontrant un effet « protecteur » d'un QTL de résistance quantitative pour le gène majeur *Rlm6* (Brun et al. 2010) ; puis sur les nématodes de la tomate (Barbary et al. 2014).

5.1.4 Exploiter l'évolution du pathogène pour augmenter la durabilité de résistance de l'hôte

La théorie évolutive fait l'hypothèse de l'existence de compromis évolutifs (trade-off) entre l'infectivité ou l'agressivité du pathogène et ses autres traits d'histoire de vie (Zhan and McDonald 2013). En acquérant ou accumulant des gènes d'infectivité, le pathogène élargit sa gamme d'hôte mais perd en compétitivité dans les situations où le gène de résistance est absent (coût de fitness). Cette théorie du trade-off est d'ailleurs pertinente sur les pathosystèmes dépourvus d'interactions gène-pour-gène, à cause du conflit existant entre agressivité du pathogène et taux de transmission. Un pathogène très agressif va maximiser son taux de reproduction dans l'hôte, mais réduit d'autant son temps de persistance dans l'hôte infecté et de transmission aux autres hôtes (Zhan et al. 2015).

Les stratégies de gestion durable des résistances doivent donc favoriser les résistances (gènes ou QTLs) qui induisent un coût de virulence maximal au pathogène, mais aussi choisir des approches qui vont limiter au maximum son potentiel évolutif (Zhan et al. 2015):

- Maximiser la dérive génétique pour réduire la variation génétique des pathogènes et atténuer leur capacité d'évolution, par la réduction de leur taille efficace de population (longues jachères, cultures associées et rotations, ...)
- Minimiser les flux de gènes pour faire baisser la diversité génétique et empêcher la dissémination de nouveaux gènes d'infectivité

- Minimiser les sources d'inoculum primaire et de nouveaux variants pathogènes par l'éradication d'hôtes alternatifs (la démonstration en a été faite sur la rouille du blé, *Puccinia graminis tritici*)
- Développer des programmes de gestion dynamique de maladie pour réduire la pression de sélection exercée par l'hôte en promouvant la sélection diversifiante.

5.2 Le contexte : comment les Solanacées résistent (tant bien que mal) à *Ralstonia solanacearum*

La sélection variétale pour la résistance des Solanacées au flétrissement bactérien a jusqu'ici essentiellement porté sur la tomate (Daunay et al. 2010, Wang et al. 1998), plus secondairement le piment (Lafortune et al. 2005, Lopes et al. 2006). Chez la tomate, n'ont été identifiés jusque-là que des QTLs de résistance issus de l'accession Hawaii7996 : *Bwr-6*, QTL majeur de résistance au spectre le plus large ; *Bwr-3*, spécifique des phylotype II ; et les QTLs mineurs *Bwr-4*, *Bwr-8* et *Bwr-12*, respectivement spécifiques du phylotype II, I-II, et I (Carmeille et al. 2006). Par la suite la cartographie du locus *Bwr-6* a été affinée, identifiant 4 zones (*Bwr6a* à *Bwr6d*) dont seule *Bwr6b* contrôle phylotype I et IIB (Wang et al. 2013). La résistance de l'aubergine au flétrissement bactérien a été peu étudiée, malgré l'identification de facteurs de résistance majeurs dans des accessions asiatiques (Cao et al. 2009, Fukuoka et al. 2010, Nunome et al. 1998, Nunome et al. 2009).

Le déploiement à l'échelle mondiale de variétés résistantes s'est très vite révélé impossible, de par l'existence de fortes interactions génotype-milieu (Wang et al. 1998), et surtout du fait de l'exceptionnelle plasticité génomique et phénotypique de *R. solanacearum* (cf. introduction).

Il n'existait à ce jour aucun système de classification ou formalisation des interactions entre les différents phylotypes de *R. solanacearum* et les différentes sources de résistance présentes chez la tomate, l'aubergine et le piment. La collaboration entre INRA, CIRAD, AVRDC dans le cadre de la thèse d'Aurore Lebeau (2007-2010) a permis de construire trois core-collections de tomate, aubergine, piment (9 accessions résistantes et 1 sensible pour chaque espèce). Ce set, appelé CORE-TEP, a été inoculé par une core-collection de *R. solanacearum* (CORE-RS2) représentant l'essentiel de la diversité du pathogène dans le monde : phylotype I, IIA, IIB, III. Dans la pathogénèse classique, *R. solanacearum* colonise le parenchyme cortical des racines avant de pénétrer les vaisseaux du xylème, dans lesquels il se multiplie et envahit l'ensemble des tissus caulinaires, atteignant des niveaux de charge bactérienne très importants (jusqu'à 10¹⁰ cellules/gramme de tissu). Les symptômes de flétrissement apparaissent à la suite de cette forte colonisation. Prenant en compte l'incidence de flétrissement et le niveau de

colonisation des tiges non flétries, des analyses multivariées ont permis d'identifier 5 phénotypes d'interaction, qui conduisent à formaliser les interactions Solanacées x *R. solanacearum* en 6 « pathoprofils » (Lebeau et al. 2011). Des résistances de haut niveau n'ont été identifiées que chez l'aubergine, avec plusieurs cas de résistance totale (appelés aussi interaction incompatible, caractérisée par une absence totale de flétrissement et de colonisation), les plus nombreuses étant chez « Dingras Multiple Purple » (codée E1), puis sur « AG91-25 » (E6), « Surya » (E4), « S56B » (E9). La tomate est surtout caractérisée par des phénotypes de résistance quantitative et partielle, et le piment plutôt par des phénotypes de tolérance (infections sans symptôme). Ces interactions incompatibles nous ont amené à l'hypothèse que la résistance des quatre accessions d'aubergine pouvait être gouvernée par une interaction de type « gène-à-gène ».

Le déterminisme génétique de la résistance d'AG91-25 (Ano et al. 1991), a fait l'objet d'une étude approfondie, par phénotypage et génotypage d'une population de 180 RILs. Un gène majeur, *Ers-1*, probablement originaire de *Solanum aethiopicum*, contrôle une résistance de haut niveau vis-à-vis de plusieurs souches du phylotype I (Lebeau 2010, Lebeau et al. 2013). Il s'agit du premier gène majeur de résistance à *R. solanacearum* identifié chez une espèce cultivée, ainsi que le premier gène de résistance à une maladie cartographiée chez l'aubergine. Ce gène a un intérêt majeur pour la création variétale chez les solanacées. Le seul gène majeur de résistance à *R. solanacearum* identifié à ce jour (*RRS1-R*) provient d'*Arabidopsis thaliana*. *ERs1* est potentiellement transférable dans d'autres variétés d'aubergine, et pourra servir à la recherche d'homologues chez la tomate et d'autres Solanacées. Un programme de transfert de ce gène dans des variétés d'aubergine locales, en combinaison avec d'autres gènes/QTL de résistance, est actuellement en cours à l'île de la Réunion (collaboration CIRAD/ARMEFLHOR). Le déploiement à grande échelle de ce gène de résistance dans les programmes d'amélioration génétique de l'aubergine, et la gestion de la durabilité de ce gène, impliquent cependant d'approfondir au préalable plusieurs points :

- Ce gène s'est montré très efficace pour contrôler des souches de phylotype I. En revanche, il n'a pas été détecté vis-à-vis de souches d'autres phylotypes.
- Ce gène est contourné par certaines souches de phylotype I, à Taiwan (PSS4) (Lebeau et al. 2013) et en Indonésie (To10) (Lebeau 2010)) ; dans la suite de ce programme, d'autres souches de phylotype I virulentes ont d'ailleurs été identifiées en Afrique de l'Ouest (N'Guessan 2013, N'Guessan et al. 2012) et en Guyane (Deberdt et al. 2014). La répartition et l'importance épidémiologique de ces variants virulents doivent être mieux connues dans les principales zones de culture.

Dans ce projet de recherche visant à trouver des résistances variétales efficaces et durables au flétrissement bactérien chez les Solanacées, nous avons donc choisi de développer une stratégie à plusieurs volets et plusieurs échelles, portant à la fois sur les déterminants génétiques de l'interaction, et sur le potentiel évolutif du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* :

- Nous avons d'abord cherché à identifier les gènes bactériens impliqués dans les interactions incompatibles, en choisissant comme modèles les couples souche x accession cités plus haut.
- Nous avons ensuite évalué la diversité de ces effecteurs candidats sur plusieurs collections, ainsi que les contraintes sélectives qu'ils subissent
- Ces suivis de diversité d'effecteur ont été combinés à une approche d'épidémiosurveillance ciblée sur l'Afrique
- Pour estimer le potentiel évolutif de *R. solanacearum* à l'échelle mondiale, nous avons reconstitué son histoire évolutive et identifié les forces évolutives majeures ayant modelé ses populations. Nous avons spécifiquement considéré l'importance de la recombinaison dans l'évolution de ce complexe d'espèces.
- Nous nous sommes ensuite placés à l'échelle d'un peuplement végétal, pour suivre les processus évolutifs impliqués dans l'adaptation d'une population parcellaire de *R. solanacearum* à l'aubergine résistante AG91-25.

5.3 « Le choix des armes » : recherche des facteurs génétiques de virulence sur aubergine et tomate

5.3.1 Identification des candidats

Au moment où ce programme a débuté, peu de séquences génomiques complètes de *R. solanacearum* étaient disponibles, mais l'équipe de C. Boucher (LIPM, Toulouse) avait développé une puce pangénomique (GMI1000, IPO1609, MOLK2) de 6516 oligonucléotides (65-mer et 70-mer) (Guidot et al. 2009), sur laquelle A. Guidot et P. Prior avaient hybridé 78 souches de la diversité mondiale, dont les 12 souches de la CORE-RS2. Cette puce a été nommée « puce7K ». Par ces données, nous avons donc accès au polymorphisme présence-absence de chaque gène (une sonde/gène), et même partiellement au polymorphisme allélique pour le cas des effecteurs de type III (deux à six sondes/gène). Nous avons donc confronté les données génotypiques d'hybridation sur puce aux données phénotypiques obtenues lors de la thèse d'Aurore LEBEAU. Pour identifier les gènes associés à la virulence ou à l'avirulence, nous avons suivi une approche de génétique d'association « top-down » telle

que décrite par Falush et Bowden (2006), permettant d'associer non seulement des gènes individuels mais des répertoires de gènes à un phénotype.

R. solanacearum possède un large répertoire de gènes contribuant à la virulence, incluant les gènes impliqués dans l'aéro- et chimio-tactisme (Yao and Allen 2006, 2007), la détoxification des formes réactives d'oxygène (Flores-Cruz and Allen 2011), les pompes d'efflux polychimiothérapeutiques (Brown et al. 2007), le secrétome Tat (Gonzalez et al. 2007), les gènes codant pour les enzymes extracellulaires sécrétées par le système de sécrétion de type II (Denny 2006) ; cependant les protéines sécrétées (effecteurs) par le système de sécrétion de type III (SST3) constituent les facteurs majeurs de virulence (Poueymiro and Genin 2009). Alors que la plupart des Protéobactéries possèdent 20 à 30 effecteurs de Type III (T3E), *R. solanacearum* se distingue par un méta-répertoire très riche (94 familles) (Peeters et al. 2013), tandis que les souches individuelles portent habituellement 60 à 75 effecteurs (Deslandes and Genin 2014).

Dans une première analyse, nous avons donc inclus les gènes contribuant à la virulence cités plus haut (22 gènes), ainsi que les gènes codant pour les profils moléculaires microbiens (MAMPs) les plus connus : lipopolysaccharides (LPS), flagelline (flg), le facteur d'élongation Tu (EF-Tu), les « cold shock proteins » (CSP), les peptidoglycanes (PGN) (Erbs and Newman 2012, Jones and Dangl 2006); le gène codant pour la superoxide dismutase (*sodM*), un autre MAMP (Watt et al. 2006), était absent de la puce 7K. Nous n'avons détecté aucun polymorphisme présence-absence parmi ces gènes, et avons alors décidé de nous focaliser sur la distribution des effecteurs de type III, et effecteurs putatifs.

Nous avons considéré les trois questions suivantes : (i) quelle est la variabilité de distribution des T3Es dans une large collection ?; (ii) la virulence sur Solanacées peut-elle être expliquée par des répertoires d'effecteurs, la présence/absence d'effecteurs individuels, ou des différences alléliques de T3E individuels ?; (iii) les T3E peuvent-ils être impliqués dans des interactions avec plusieurs accessions, ou existe-t-il une spécificité d'accession ?

La stratégie d'association phénotype-génotype est détaillée sur la Figure 13, en partant des données phénotypiques générées par A. Lebeau (Figure 12 ci-dessus).

Nous avons ainsi distingué deux pools « souches avirulentes » et « souches virulentes » pour chaque accession considérée, et comparé leur contenu en gènes d'après les données CGH. Toutes les sondes présentes dans le pool « avirulent » et absentes du pool « virulent » étaient assignées en « sondes putatives d'avirulence », et inversement pour les « sondes putatives de virulence » (Pensec et al. 2015).

L'Effectome de *Ralstonia solanacearum* : riche, peu caractérisé

Dans le répertoire d'effecteurs de *R. solanacearum*, la grande majorité sont encore de fonction inconnue. Les gènes gouvernant les interactions spécifiques de *R. solanacearum* avec ses hôtes ont essentiellement été identifiés chez les espèces modèles *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* (voir pour cela l'excellente revue de Deslandes et Genin (2014)). Le cas le plus documenté est celui de l'acétyltransférase popP2 (Deslandes et al. 2003), récemment renommé **ripP2** (Peeters et al. 2013), dont l'interaction avec le gène d'*A. thaliana* RRS1-R (Deslandes et al. 1998, Deslandes et al. 2002) et la cystéine protéase RD19 (Bernoux et al. 2008) déclenchent la réponse immunitaire végétale. RipP2 constitue à ce titre le tout premier gène d'avirulence décrit chez *R. solanacearum*. Récemment, il a été démontré que RRS1-R forme en fait un complexe de récepteur avec RPS4 (conférant la résistance à *Pseudomonas syringae*) qui détecte les effecteurs ciblant les domaines WRKY. RPS4 détecte l'interaction RipP2-RSS1-R et convertit l'activité lysine-acétylase de RipP2 en réponse immunitaire (Le Roux et al. 2015, Sarris et al. 2015). Parmi les autres effecteurs identifiés, **ripP1** induit la Réaction Hypersensible (HR) sur certaines espèces de Pétunia et Tabac (Poueymiro et al. 2009, Poueymiro and Genin 2009), et **ripG7** (GALA7) détermine le pouvoir pathogène sur *M. truncatula* (Angot et al. 2006) sans que sa fonction exacte et sa/ses cible(s) végétale(s) soient encore élucidées. Au cours du processus infectieux chez *M. truncatula*, **ripAA** (anciennement AvrA) et **ripG7** sont impliqués de concert dans la pénétration des racines et colonisation du parenchyme cortical ; **ripAA** est ensuite impliqué spécifiquement dans la colonisation des vaisseaux du xylème tandis que **ripG7** a une très forte contribution dans le développement de symptômes (Turner et al. 2009).

En revanche, les effecteurs bactériens essentiels pour la virulence ou avirulence sur les espèces cultivées restent largement méconnus. La protéase Zinc-dépendante rip36 (Nahar et al. 2014), renommée **ripAX2** (Peeters et al. 2013), induit une HR sur *Solanum torvum*, une espèce apparentée sauvage de l'aubergine. **RipA2** contribue à la virulence sur tomate, tandis que **ripA5** induit une HR-like sur certaines espèces de tabac (Sole et al. 2012, Solé et al. 2010). Les effecteurs **ripG2**, **ripG3**, **ripG6** et **ripG7** contribuent collectivement à la virulence sur tomate et *Arabidopsis* (Remigi et al. 2011).

| Accession (code) | | AVIRULENT (phenotype 0) | VIRULENT (phenotypes 4-5) | Phylotype I |
|---|-----------------|---|--|---------------|
| A u b e r g i n e | Dingras (E1) | CMR32 CFBP2957 GMI1000 | CFBP6783 | Phylotype IIA |
| | SM6 (E2) | CMR32 CFBP2957 CFBP6783 | PSS4 PSS366 | Phylotype IIB |
| | Ceylan (E3) | CMR32 CMR15 CFBP2957 CMR39 PSS358 | CFBP6783 | Phylotype III |
| | Surya (E4) | CMR32 CFBP2957 | CMR15 | |
| | AG91-25 (E6) | CMR32 CMR39* | CFBP3059 CMR15 CFBP6783 CMR34 | |
| T o m a t e | Hawaii7996 (T5) | CMR32 CMR39 | CMR15 CMR34 CFBP6783 | |
| | PM687 (P2) | PSS358 | CFBP3059 CFBP6783 CMR39 | |
| | CA8 (P6) | CFBP2957 CMR39 | CFBP6783 | |
| | Perennial (P8) | CMR15 | CFBP6783 | |

Figure 12. Synthèse des pools de souches avirulentes /virulentes considérés pour l'analyse d'association sonde-phenotype. L'avirulence est définie comme une absence complète de flétrissement et colonisation sur l'accèsion considérée. Les souches virulentes son capables de flétrir et coloniser les accèsions, induisant un phenotype 4 ou 5 *sensu* Lebeau et al 2011. Les souches de *R.solanacearum* appartiennent au phylotype I (rouge), IIA (orange), IIB (vert), or III (bleu).

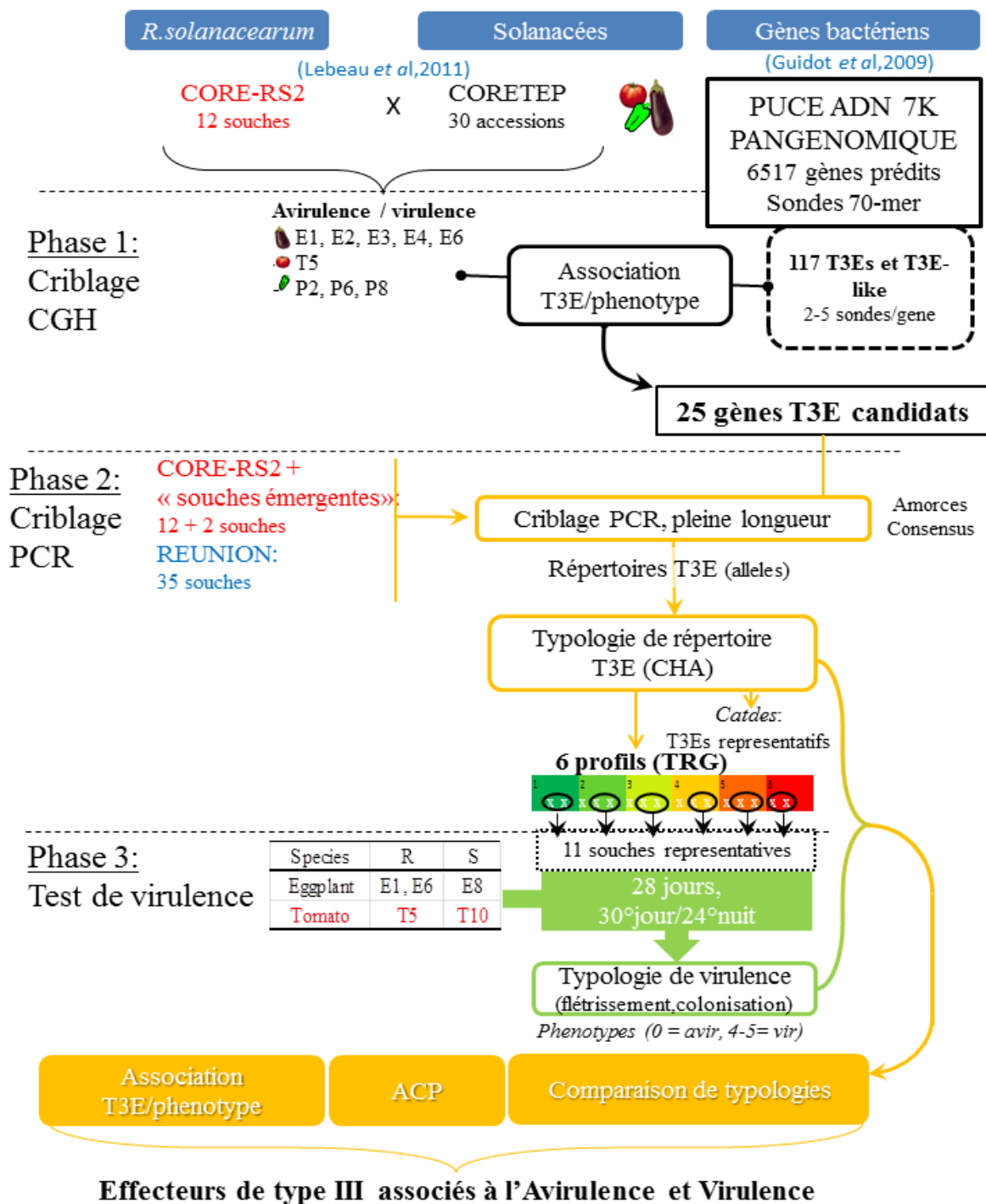


Figure 13. Stratégie d'association Génotype-Phénotype. Les données de base ont été générées par (Lebeau 2010, Lebeau et al. 2011) et Guidot et al. (2009). T3E: Effecteur de Type III, CHA: Classification Hiérarchique Ascendante, TRG: Groupe de Répertoire de T3E. Les T3Es les plus représentatifs de chaque TRG ont été déterminés par la fonction *catdes* (R, package FactoMineR). En phase 3, les accessions d'aubergine et tomate sont soit résistantes (R) soit sensibles (S).

Cette première phase a permis de comparer les distributions d'effecteurs entre phylotypes, du moins pour les phylotype I, IIA et IIB, et III, et de constituer un **premier instantané de la distribution de T3Es dans une collection naturelle**. Les souches de phylotype III semblent contenir moins de T3Es (61 à 67) que les autres phylotypes (73 à 78). Sur notre jeu de données de 12 souches, le phylotype n'avait pas d'influence détectable sur la distribution d'effecteurs (tests Chi-2 non significatifs) mais certains effecteurs semblent associés à un phylotype particulier : *ripC1*, phylotype II-spécifique ; *ripA5.2*, absent du phylotype III ; *ripG1*, phylotype I-spécifique ; *ripBH*, phylotype II-spécifique. Le core-effectome de la coreRS2 contient 40 effecteurs, différent donc du core-effectome publié par Peeters et al. (2013).

D'après le criblage PCR effectué en phase 2 sur la collection Réunionnaise (n=35) sur le répertoire partiel (25 T3Es), 6 profils de répertoires (Type III Repertoire Group, ou TRG) ont été identifiés, basés sur la présence des T3Es mais aussi leur forme allélique. L'effecteur le plus polymorphe était *ripG3* (4 allèles de taille), à mettre en perspective avec les signatures de sélection diversifiante détectées sur ce gène (Remigi et al. 2011). *RipA2*, *ripA4* et *ripW* étaient présents dans toute la collection. *RipA2* et *ripA4* apparaissaient monomorphes, et il est intéressant de constater que *ripA2*, pourtant contribuant à la virulence sur tomate (Sole et al. 2012), a été amplifié dans des souches avirulentes sur la tomate Hawaii7996 (T5). Cette contradiction apparente peut être expliquée par un polymorphisme de séquence ou une redondance fonctionnelle ; cela pourrait indiquer aussi un rôle dual de *ripA2* dans la tomate, supportant ainsi le nouveau modèle d'Invasion (Cook et al. 2015).

Grâce aux données hébergées en 2015 sur le site « [RalstoT3E](#) », comptant 26 génomes complets dont une majorité de phylotype II mais un seul phylotype III, nous avons pu évaluer la distribution des effecteurs dans la diversité du complexe d'espèces, et constater que le phylotype IV avait des répertoires relativement spécifiques (8 effecteurs) ; le phylotype I comptait lui aussi 6 effecteurs spécifiques (Pensec et al. 2015).

En comparant ce répertoire génomique au répertoire issu des hybridations sur puce 7K, nous avons constaté l'absence sur la puce de 20 T3Es *sensu* (Peeters et al. 2013). Mis à part *ripAI* qui était un core-effecteur selon plusieurs études (Ailloud et al. 2015, Clarke et al. 2015, Peeters et al. 2013), ces « effecteurs manquants » sont en fait spécifiques du phylotype IV, ou trouvés dans des souches de phylotype IIB. Le core-effectome déduit de ce jeu de données génomique diffère également de celui sur puce, puisque seuls 11 core-effecteurs ont été trouvés (Tableau S3 de Pensec *et al* 2015). A titre de comparaison, les dernières études de génomique focalisées sur le phylotype II donnaient des core-effectomes de 14 T3Es (Ailloud et al. 2015) ou 31 T3Es (Clarke et al. 2015). Il est donc urgent de séquencer de nouveaux

génomés, notamment dans le phylotype III et le phylotype I, pour approcher la composition réelle du core-effectome du complexe d'espèces *R. solanacearum*.

L'analyse des répertoires de la core-RS2 révèle l'association de plusieurs T3Es aux phénotypes de virulence

Soixante gènes ont été associés à l'avirulence, essentiellement sur piment P8, et les aubergines E6, E2, E1, E3 et E4 (la correspondance entre accessions et codes est synthétisée sur la Figure 12) ; seul *ripAX2* était associé à l'avirulence sur tomate T5. Nous nous sommes focalisés sur les 31 gènes dont (i) au moins 50% de sondes étaient associées à l'avirulence sur une accession, et/ou (ii) étaient associées à l'avirulence sur E1 et E6 (même avec moins de 50% des sondes), et/ou (iii) contribuaient à la fitness bactérienne sur au moins un hôte (Macho et al. 2010). Point intéressant, nous avons décelé 20 cas de double association (sur une aubergine et le piment P8), et même cinq gènes associés à l'avirulence sur trois accessions.

Soixante-treize gènes ont été associés à la virulence, essentiellement sur piments P8 et P2, ainsi que les aubergines E2, E3, E1, E4 et E6 et la tomate T5. Nous nous sommes focalisés sur les 37 gènes dont au moins 50% des sondes étaient associées à la virulence sur au moins une accession.

Certains effecteurs ont une association duale avirulence-virulence

Trente-sept effecteurs ont été associés à la fois à la virulence et avirulence : dans plusieurs cas, les effecteurs étaient hautement associés à l'avirulence sur aubergine et à la virulence sur piment (*ripP1*, *ripAZ1*), ou inversement (*ripAF1*, *RSp0213*).

A l'issue de cette phase, 25 effecteurs candidats (16 associés à l'avirulence, 9 associés à la virulence) ont été retenus pour un criblage PCR (phase 2, Figure 13).

Les phénotypes d'avirulence et virulence ne sont pas expliqués par les répertoires, plutôt par des effecteurs individuels.

Lors de la phase 2, portant sur les 25 effecteurs les plus prometteurs, nous avons identifié six groupes de répertoires d'effecteurs (Type III Effector Group, TRG).

Lors de la phase 3 (figure 13), certaines souches de phylotype et TRG identiques ont présenté des phénotypes de virulence très différents (RUN0054 et RUN0157 par exemple, Figure 14), tandis que d'autres souches de phénotype identique étaient dans des TRG différents (par exemple, RUN0157 (TRG5) et RUN0941 (TRG3)).

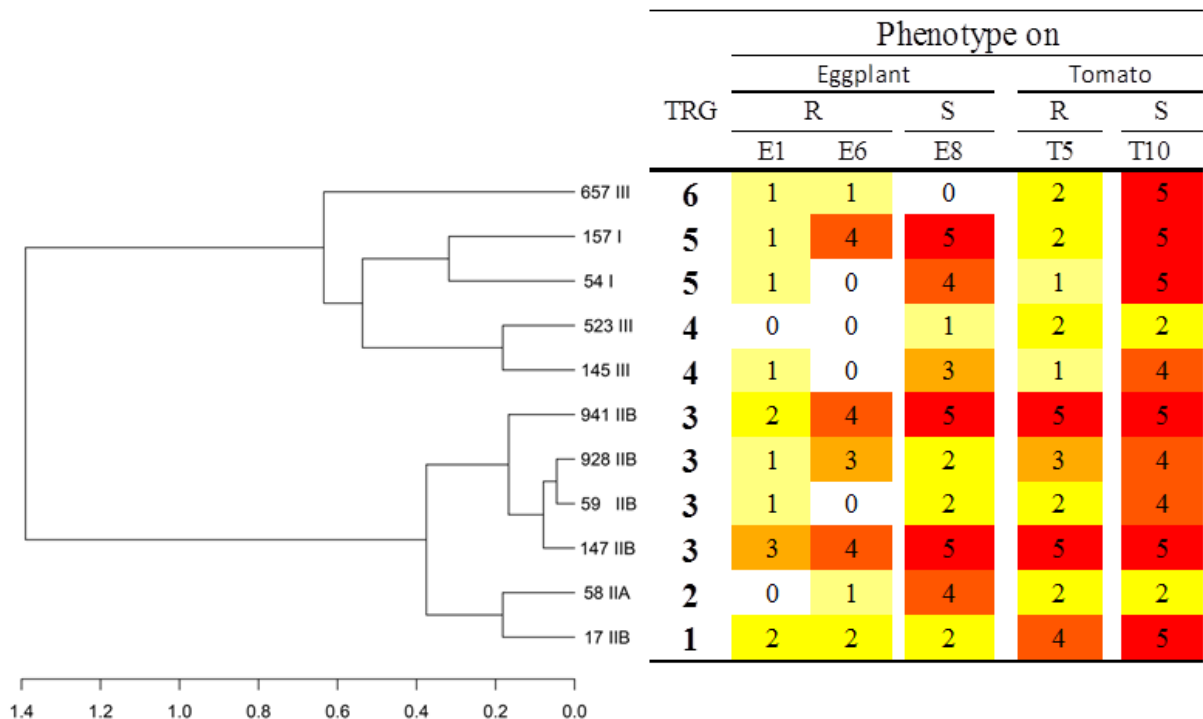


Figure 14. Les génotypes T3E ne cadrent pas avec les phénotypes de virulence. Classification hiérarchique ascendante basée sur les répertoires T3E des souches *R. solanacearum* (nommés par numéro RUN et phylotype), et correspondance avec les phénotypes^a observés sur aubergines et tomates résistantes (R) et sensibles (S). TRG: Type III effector Repertoire Group (Pensec et al. 2015).
^a Le phénotype a été défini sur la combinaison de l'incidence finale de flétrissement et l'indice de colonisation, et calculé selon Lebeau et al.(2011), où 0 =résistance totale (0 flétrissement ET 0 colonisation), 1=hautement résistant, 2=résistant, 3=partiellement résistant, 4=modérément sensible, et 5=hautement sensible.

Ceci est la claire démonstration que l'hypothèse « répertoire-pour-répertoire » posée pour expliquer la structuration de la spécificité d'hôte chez *Xanthomonas* (Hajri et al. 2009), ne peut s'appliquer à *R. solanacearum*.

En revanche, nous avons combiné des résultats d'analyse en composante principale avec une « approche stringente », qui identifiait en phase 3 (i) les T3Es d'avirulence, définis comme les T3Es présents dans toutes les souches avirulentes **et** absents de toutes les souches virulentes, et (ii) les T3Es de virulence, définis comme les T3Es absents de toutes les souches avirulentes **et** présents dans toutes les souches virulentes. Cette combinaison d'approches a permis d'identifier une courte liste de T3Es candidats les plus prometteurs :

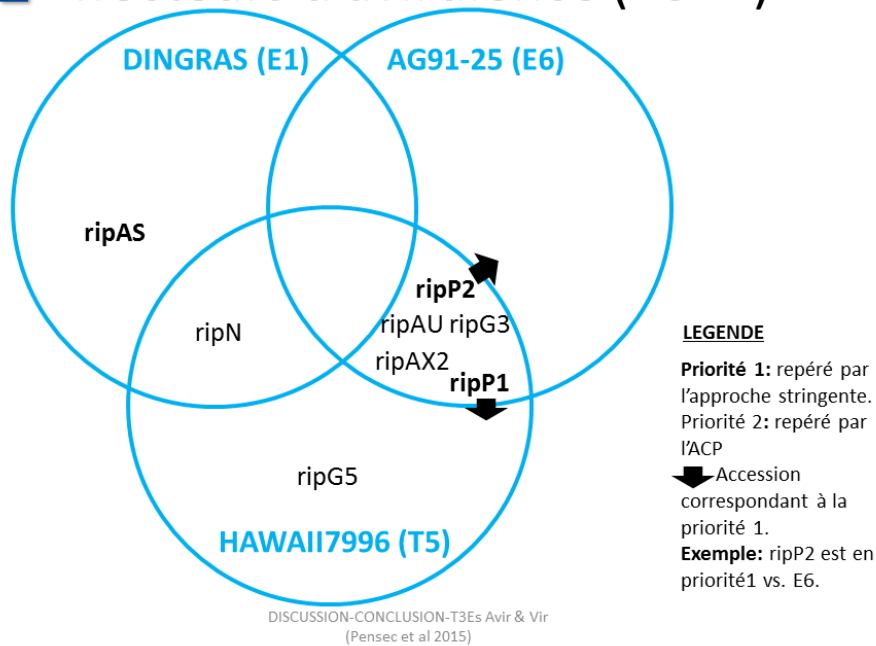
- Parmi les T3Es associés à l'avirulence, *ripP2* semble être le meilleur candidat (Figure 15 A), suivi de *ripAU* et *ripG3*, *ripP1* et *ripAX2*, tous associés à l'avirulence sur AG91-25 (E6).

Suivent *ripN*, et *ripAS*. Comme *ripG5* est seulement associé à l'avirulence sur T5, et qu'il est exprimé en opéron avec *ripG4*, nous avons choisi de l'exclure de notre liste finale.

- Parmi les T3Es associés à la virulence (Figure 15B), les candidats les plus prometteurs semblent être PT03558 et *ripU*, puis *ripA5_2*, *ripV2* et BA7003. Il sera par contre essentiel de vérifier que PT03558 et BA7003 sont bien exprimés, et sécrétés par le SST3.

Cette étude a également identifié des T3E, non retenus dans notre projet, qui mériteraient l'attention des experts travaillant sur les interactions *R. solanacearum* /piment. En particulier plusieurs cas de phénotypes différentiels aubergine-piment interpellent : *ripP1* et *ripAZ1* ont été associés à l'avirulence sur Surya (E4) et la virulence sur piment « Perennial » (P8). L'homologue de *ripP1* chez *Xanthomonas euvesicatoria*, *XopJ* (anciennement *AvrXv4*), a une fonction d'avirulence sur tomate (Astua-Monge et al. 2000), mais réduit l'accumulation d'acide salicylique sur piment (Ustun et al. 2013). *RipAF1*, inversement, a été associé à la virulence sur les aubergines SM6 et Surya et l'avirulence sur le piment « Perennial ». Ceux-ci ajoutent aux exemples du rôle dual de nombreux effecteurs de type III souligné par (Cook et al. 2015), contribuant à la virulence ou à la fitness bactérienne dans un cultivar mais étant spécifiquement reconnu par d'autres cultivars (avirulence).

A Effecteurs d'avirulence (2011)



B Effecteurs de virulence (2011)

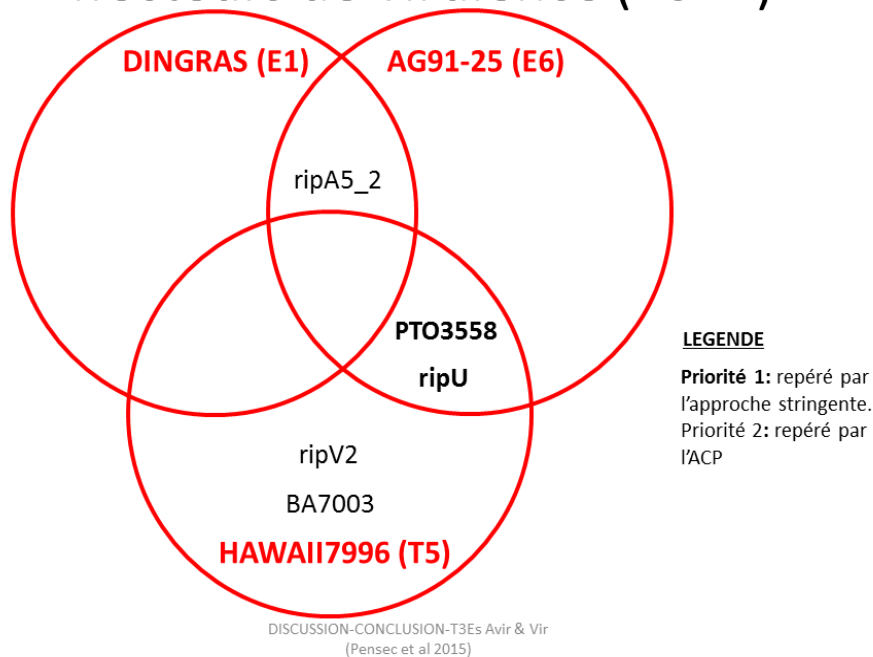


Figure 15. Effecteurs de type III retenus pour leur forte association à l'avirulence (A) ou la virulence (B).

Dans cette identification de candidats, nous nous sommes intéressés uniquement au polymorphisme à l'échelle du répertoire ou du gène (présence/absence, insertion/délétion,

intragénique), alors que les changements de spécificité d'hôte peuvent être provoqués par des modifications génétiques à des échelles très différentes (SNP, changement de résidu, insertions/délétions intragéniques ou totales, répertoire de gènes, îlot génomique) (Kirzinger and Stavrinos 2012).

Les étapes suivantes du projet ont donc consisté en :

- une analyse du polymorphisme nucléotidique des différents effecteurs d'avirulence choisis, et de leurs zones promotrices
- une validation de la fonction d'avirulence de ces candidats

5.3.2 Polymorphisme nucléotidique des T3Es candidats d'avirulence et distribution mondiale

Nous avons estimé le polymorphisme nucléotidique des 7 T3Es candidats d'avirulence, auxquels nous avons ajouté 3 autres candidats, *ripE1*, *ripAJ* et *ripAZ1*, repérés en phase 1 mais non considérés dans les phases suivantes. Les deux premiers provoquent une réaction de type HR sur MM853 (E1), d'après des tests d'expression transitoire menés à VirginiaTech (Clarke et al. 2015), et sont donc des candidats d'avirulence prometteurs.

C'est donc la distribution et le polymorphisme de séquence nucléotidique de 10 effecteurs de type III (*ripP1*, *ripP2*, *ripG3*, *ripN*, *ripE1*, *ripAX2*, *ripAJ*, *ripAS*, *ripAZ1*, *ripAU*) qui ont été estimés sur une collection mondiale de 91 souches de *R. solanacearum* isolées de Solanacées dans 13 régions d'importance agronomique et/ou abritant des stations de sélection variétale (Guyane, Martinique ; Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Cameroun, Afrique du Sud ; Réunion ; Inde ; Taiwan, Philippines, Thaïlande, Indonésie ; Australie). Nous avons systématiquement cherché à amplifier et séquencer le gène T3E, mais aussi ses zones promotrices afin de détecter d'éventuels polymorphismes dans la séquence codante et les séquences régulatrices de l'expression génique.

Les effecteurs *ripAJ* et *ripE1* sont les plus partagés (respectivement 100 et 97.8% des souches), mais seul *ripAJ* est polymorphe. A l'opposé, seuls *ripP1* et *ripP2* sont présents à des fréquences inférieures à 82% (69.1 et 67.0% respectivement). Dans une première analyse, nous avons cherché les effecteurs les plus polymorphes et présentant des phylogénies non congruentes avec la phylogénie de l'espèce (MLSA sur gènes de ménage), posant l'hypothèse que ces incongruences seraient associées à des transferts horizontaux (HGT) ou à une convergence fonctionnelle. Les effecteurs dans ce cas sont *ripP1* (22.2% d'incongruence), *ripP2* (8.2%), *ripAX2* (8%), *ripE1* (5.6%). Des analyses complémentaires, notamment des

zones promotrices, sont en cours. Les analyses de sélection seront complétées durant le dernier trimestre 2015.

Parallèlement, le séquençage complet Illumina HiSeq de 9 souches virulentes ou avirulentes sur E6 (dont 2 ont été isolées sur le dispositif d'évolution expérimental du Vallon, détaillé en 2.7.1.5.) a permis d'accéder au répertoire complet d'effecteurs de type III sans *a priori* (50 à 73 effecteurs suivant les souches) grâce au « genome scan » proposé par la plateforme « [RalstoT3E](#) » (Peeters et al. 2013). D'après une première analyse, l'avirulence sur *ERs1* est très associée à la présence de *ripP2* et *ripAX2*, mais aussi *ripA1* (présents chez tous les avirulents *Ers1*, absents des virulents sauf une souche). Les génomes ont également été annotés automatiquement par la plateforme MicroScope (Vallenet et al. 2013) pour comparer les environnements génomiques de ces effecteurs. Ces résultats vont faire l'objet d'un article dans *Genome Announcements*.

5.3.3 Validation fonctionnelle de la fonction d'avirulence des T3Es sur AG91-25 (E6)

Dans le cadre d'une collaboration avec N. PEETERS, du LIPM Toulouse (**LIPM**) et B. VINATZER de VirginiaTech (**ViTEC**), nous avons essayé de valider expérimentalement la fonction d'avirulence supposée des 7 effecteurs de type III identifiés plus haut. Selon le modèle de Jones et Dangl (présenté en début de chapitre), la reconnaissance de l'« effecteur d'avirulence » par la protéine R végétale déclenche l'ETI, une cascade de réponses de défense très rapides et de haute intensité, incluant une réaction hypersensible, macroscopiquement identifiable sur feuille par un brunissement et un effondrement du parenchyme cortical, qui s'accompagne d'autres manifestations physiologiques (fuite d'électrolytes, dégagement de formes réactives d'oxygène (ROS), dépôt de callose et lignine,...). Cette reconnaissance peut aussi se traduire par une forte chute de la charge bactérienne dans les tissus sans HR observable.

Dans cette étude fonctionnelle, plusieurs stratégies complémentaires ont donc été mises en œuvre, répondant chacune à une question spécifique :

1. *L'inactivation de l'effecteur ciblé rend-elle la souche virulente sur E6?*

Approche 1 : Des mutants défectifs simples de GMI1000 (RUN0054) ont été inoculés sur E6 (résistant) et E8 (sensible), pour comparer la progression de maladie (symptômes de flétrissement) à celle provoquée par le type sauvage (**LIPM**)

2. *L'injection de l'effecteur dans la plante induit-elle une réponse de la plante ?*

Approche 2 :

- a. *Une Réaction Hypersensible sur feuille ?* Des agro-injections des allèles GMI1000 de chaque T3E ont été menées sur feuille de E6 (résistant) et E8 (sensible) **(LIPM)**
- b. *Des réactions de défense induisant une diminution de la population bactérienne in planta (charge bactérienne) ?* Les allèles GMI1000 de chaque T3E ont été clonés puis exprimés de façon hétérologue par *Pseudomonas syringae* DC3000 et *Pseudomonas fluorescens* EtHAn (Effector-to-Host Analyzer), et injectés dans les feuilles de E6 et E8 **(ViTEC)**

3. *La réponse de plante varie-t-elle selon les allèles présents dans les populations naturelles ?*

Approche 3 : Les différents allèles d'effecteurs identifiés dans les collections naturelles devaient être clonés, exprimés dans les vecteurs DC3000 et EtHAn, et testés sur plante.

EtHAn (Thomas et al. 2009)

Le système « Effector-to-Host Analyzer » est une construction incluant l'intégration de la région hrp/hrc de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (codant pour le SST3) dans la bactérie du sol *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. Ce système permet d'analyser la /les fonctions *in planta* d'effecteurs de type III individuels.

Au cours de l'approche 1, neuf mutants simples (seul GMI1000- Δ ripAZ1 était indisponible) et 18 mutants multiples ont été inoculés. Seul le mutant Δ ripAX2 est devenu virulent sur E6 et E8, et la complémentation de ce mutation a restauré l'avirulence. L'approche 2 s'est donc focalisée sur cet effecteur, ainsi que les T3Es les plus prometteurs, *ripP1* et *ripP2*.

Les résultats actuels montrent une **claire implication de ripAX2 dans l'avirulence** : son absence induit une virulence de la souche, sa présence induit aussi une forte baisse de charge bactérienne dans les feuilles mais aussi dans la tige.

Les approches 2 et 3 sont encore en cours pour le cas de *ripAX2* ; l'étude de *ripP1* et *ripP2* serait aussi prometteuse, dans le cadre d'un nouveau projet.

Dans les collections naturelles, plusieurs souches virulentes sur E6 sont porteuses de *ripAX2*. Plusieurs cas de figure ont été distingués :

- Certaines ont une protéine tronquée, non fonctionnelle (cas de To10)

- D'autres possèdent l'allèle GMI1000 du gène, mais présentent des zones promotrices très différentes des souches avirulentes (cas de RUN1744)
- Certaines souches avirulentes et virulentes partagent exactement le même allèle

Par ailleurs, les résidus critiques pour l'avirulence sur aubergine cultivée restent à identifier. Le motif « Zn-Binding site » HExxH (et notamment E₁₄₉, identifiés comme critiques pour l'avirulence sur *S. torvum* par Nahar et al. (2014)), sont conservés chez virulents et avirulents (allèle principal : HELIH). Par ailleurs certains virulents contiennent *ripAX2*, et l'analyse de leurs zones promotrices et allèle du gène est encore en cours...La route est peut-être encore longue sur cette belle histoire !

Ces travaux ont fait l'objet de deux stages Master (Flora Penssec en 2010, Lakshmi SUJEEUN en 2014), d'une partie de la thèse de J. GUINARD, et ont fait l'objet d'une publication de rang A, une publication soumise, et une publication en préparation.

Penssec Flora, Lebeau Aurore, Daunay MC, Chiroleu Frédéric, Guidot Alice, Wicker Emmanuel. 2015. Towards the identification of Type III effectors associated to *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant. *Phytopathology* Online First [IF: 3.119 ; NC : 0]

Guinard Jérémy, Vinatzer Boris, Poussier Stéphane, Lefeuvre Pierre, and Wicker Emmanuel. 2015. Draft Genome sequence of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*). Soumis à *Genome Announcements*.

J. Guinard, K. Wang, M.-C. Daunay, J. Dintinger, S. Genin, B. Vinatzer, N. Peeters, E. Wicker. 2015. The *Ralstonia solanacearum* Type III effector RipAX2 is conferring avirulence on the eggplant AG91-25. *Mol Plant Pathol* à soumettre

Les niveaux de résistance identifiés chez l'aubergine ont amené à l'hypothèse de relations gène-à-gène dans les interactions avec *R. solanacearum*, mais ont aussi montré l'intérêt de cette espèce comme source de résistance potentielle à d'autres bactéries phytopathogènes des Solanacées *Xanthomonas euvesicatoria* (*Xeu*) et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*). D'après les travaux de l'équipe de B. VINATZER (VirginiaTech, USA), *Pto* et *Xeu* sont bien pathogènes de l'aubergine ; les accessions MM195 et MM643 (respectivement E7 et E2 (Lebeau et al. 2011)) répondent par une mort cellulaire à l'infection de *Pto* DC3000, et bloquent la multiplication *in planta* de *Xeu* par un mécanisme n'impliquant pas la HR. La résistance de MM195 à *Xeu* semble d'ailleurs de nature polygénique.

Clarke C.R., Hayes B.W., Runde B.J., Wicker E., Vinatzer B.A. 2014. Eggplant and related species are promising genetic resources to dissect the plant immune response to *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas euvesicatoria* and to identify new resistance determinants. *Molecular plant pathology*, 15 (8): 814-822. [IF: 4.485 ; NC : 0]

5.4 Quelles sont les forces majeures modelant l'évolution du complexe d'espèces *R.solanacearum* , et les composantes du potentiel évolutif ?

Comme présenté plus haut, *Ralstonia solanacearum* est un cas à part parmi les bactéries phytopathogènes, par son exceptionnelle diversité et plasticité génomique et phénotypique. Les pathogènes généralistes, qui infectent des hôtes génotypiquement variables, n'atteignent pas forcément un unique optimum de virulence, défini comme le niveau de virulence qui maximise l'agressivité et le taux de transmission (Woolhouse et al. 2001). Un pathogène généraliste très agressif va être capable de coloniser un grand nombre de d'hôtes, mais va être faiblement transmis s'il dépasse le seuil de tolérance de l'hôte et induit une mortalité. Or l'induction de mortalité de l'hôte semble être une caractéristique majeure du cycle de vie de *R.solanacearum*. C'est une espèce généraliste, dont il reste à comprendre le potentiel de virulence, les trade-offs entre phases d'association aux plantes et vie tellurique, gamme d'hôtes, histoire de vie (Stavrínides 2009).

Les Transferts Horizontaux de Gènes (HGT) et la pathoadaptation semblent être les principaux mécanismes par lesquels les pathogènes génèrent de la variation de virulence (Stavrínides 2009). Il a été démontré expérimentalement que *R.solanacearum* peut devenir apte à la compétence *in planta* et capter ainsi de l'ADN étranger (Bertolla et al. 1999), et que ce mécanisme peut être impliqué dans son adaptation à un nouvel hôte (Coupat-Goutaland et al. 2011). Mais la contribution de la recombinaison à l'histoire évolutive de *R.solanacearum* et à sa microévolution restait complètement inconnue. Nous avons donc lancé un schéma d'analyse de séquences multilocus à 9 gènes (MLSA, 7 gènes du chromosome, 2 gènes du mégaplasmide) sur une collection de 90 souches de *R.solanacearum*, rassemblant les 4 phylotypes et 51 séquévars connus en 2011, ainsi que plusieurs représentants des différents écotypes (Wicker et al. 2012). Comme *R.solanacearum* est considéré comme potentiellement recombino-gène, nous avons combiné une approche phylogénétique classique à une approche de généalogie de gènes par coalescence, pour évaluer (i) l'importance de la recombinaison dans l'évolution de *R. solanacearum*, (ii) sa distribution dans les différents phylotypes, (iii) la validité des écotypes comme lignées évolutives distinctes, (iv) les profils démographiques et biogéographiques des phylotypes, et (v) leur profil de descendance le plus probable. Le grand intérêt du coalescent est qu'il permet de reconstruire en remontant dans le temps la généalogie d'une collection, et d'inférer les paramètres principaux de génétique des populations (contributions relatives de la recombinaison et mutation à l'évolution des séquences, paramètres démographiques).

La recombinaison est ubiquiste dans le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Species Complex, RSSC)...

Les incongruences relevées entre phylogénies de gènes individuels, notamment *adk*, *fliC*, *gyrB*, ainsi que la présence de réticulations sur les réseaux phylogénétiques (Neighbor-net), laissaient soupçonner des phénomènes de recombinaison. Le logiciel RDP3 (Martin et al. 2010) a identifié 21 évènements de recombinaison intergéniques sur le concaténat (5625 bp au total), et inféré les parents mineur (donneur) et majeur (receveur) de chacun de ces évènements. Ces évènements de recombinaison touchaient 7 des 9 gènes concernés, dont le gène de l'endoglucanase *egl*, utilisé comme référence !

Cette étude a du coup permis de préciser le choix des gènes les plus pertinents pour obtenir des phylogénies fiables. Dans notre jeu de données, seuls *leuS* (Leucyl tRNA synthétase) et *mutS* (enzyme de réparation des mésappariements de l'ADN) ont été trouvés exempts de recombinaison. Ces deux gènes sont donc à utiliser en priorité en phylogénie, notamment pour étayer les résultats donnés par le gène *egl*.

Le réseau des échanges de gènes construit sur les bases de cette analyse (Figure 16) fait clairement apparaître le phylotype IV comme « donneur universel » de gènes. Il apparaît également que tous les phylotypes échangent du matériel génétique entre eux, à l'exception des phylotypes I et III.

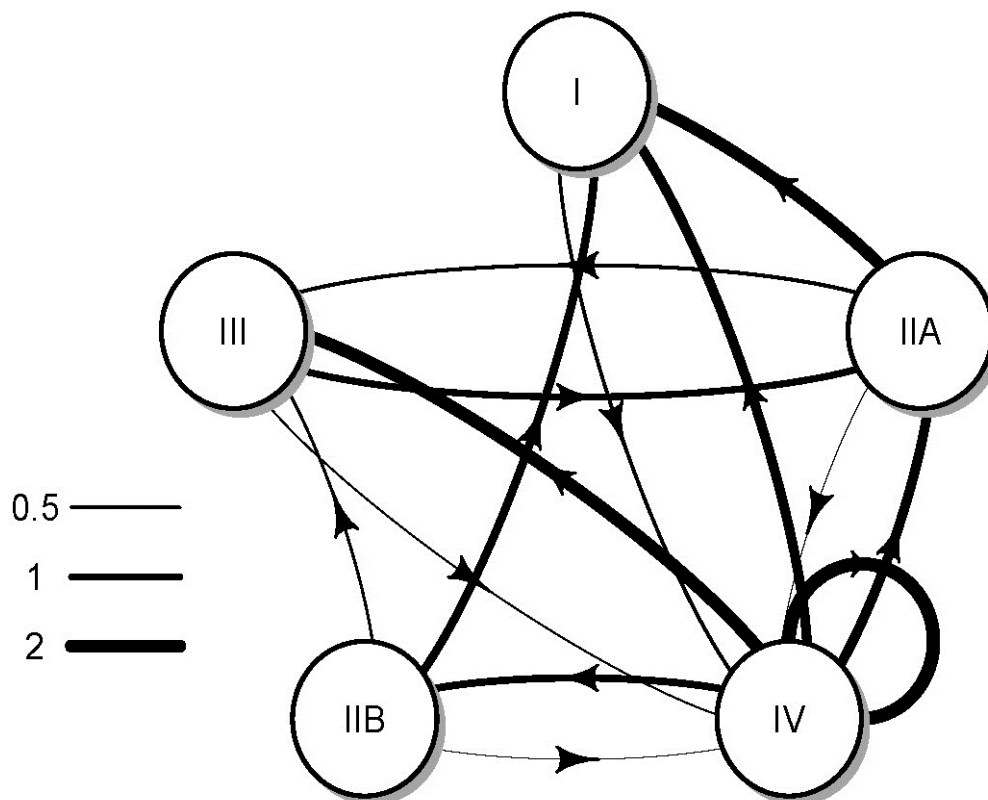


Figure 16. Réseau d'échanges de gènes entre les phylotypes de *Ralstonia solanacearum*, établi d'après les résultats RDP3. Les échanges de gènes sont figurés par des flèches orientées du donneur (parent mineur) vers le recombinant. L'épaisseur de flèche est proportionnelle au nombre d'événements de recombinaison inférés entre gènes (Wicker et al 2012).

... mais elle n'est pas uniformément répartie

Pour juger de l'importance de la recombinaison, nous avons utilisé plusieurs mesures : entre autres l'indice PHI, le niveau de déséquilibre de liaison multilocus estimé par l'indice d'association I_A , le rapport des taux de recombinaison et mutation (ρ/θ), la mesure des contributions relatives des recombinaisons et mutations à chaque substitution nucléotidique et donc à la diversité globale de l'échantillon (r/m). Cette dernière mesure est particulièrement intéressante pour comparer les niveaux de recombinaison homologue (Homologous Recombination Rate, HRR) entre genres ou espèces bactériennes (Vos and Didelot 2009). Globalement, un large contraste est observé entre les phylotypes recombinogènes à très recombinogènes (phylotypes IV, III, I ; r/m respectifs de 29.9, 24.2, 13.4), le phylotype IIA recombinogène ($r/m=2.26$), et le phylotype IIB clonal ($r/m=0.71$).

Le RSSC contient 5 lignées évolutives principales et 8 clades, aux dynamiques démographiques spécifiques

Pour reconstituer l'histoire évolutive du RSSC et de sa démographie, nous nous sommes appuyés sur la topologie des généalogies par coalescence, plus précisément sur le rapport de longueur des branches internes et externes (indice *InExt* (Didelot and Falush 2007)). Les patrons biogéographiques ont été inférés par une approche bayésienne de reconstruction des états ancestraux (programme BayesTrait), qui assigne à chaque nœud ancestral une origine géographique la plus probable.

D'après les généalogies et la phylogénie par maximum de vraisemblance, les phylotypes I, IIA, IIB, III, et IV, constituent bien 5 lignées évolutives distinctes. IIA, IIB et IV sont chacun subdivisés en 2 clades distincts, respectivement Clades 2 et 3, 4 et 5, 7 et 8. L'orientation des flux de gènes, les topologies et longueurs de branches, et les inférences phylogéographiques ont permis de proposer que le **phylotype IV était le phylotype le plus proche de l'ancêtre commun de *R.solanacearum*** ; ce phylotype, très variable mais en équilibre démographique (i.e. pas en expansion), est très probablement originaire d'Australie/Indonésie, confirmant les précédentes hypothèses (Fegan 2005). Par la suite, et peut-être suite à un changement de niche écologique lui permettant d'être disséminé (infection de rhizomes, tubercules, peut-être semences), un sous-groupe a migré vers l'Afrique de l'Est et Afrique Australe, où ont divergé le phylotype III (prédit d'origine Ouest-centre Africaine) et le phylotype I (prédit d'origine Nord-Asiatique mais aussi Est Africaine), probablement à une période précédant la fragmentation du Gondwana.

Phylotype I et III partagent la même histoire démographique (expansion récente et rapide) et le même niveau de recombinaison ; le fait que seul le phylotype I soit pandémique est sans doute dû à des différences de fitness écologique, à explorer plus avant. Le Phylotype I a très probablement envahi le monde depuis l'Asie, peut-être suite à sa migration depuis l'Afrique via l'Inde. La clarification de ce scénario nécessite d'analyser des populations en Afrique de l'Est, à Madagascar et en Inde. Surtout, ses caractéristiques démographiques et sa prévalence mondiale actuelle suggèrent une expansion récente et très rapide sur de longues distances, très probablement sous forme d'infections latentes dans du matériel végétal contaminé (tubercules de pomme de terre, boutures ornementales, semences ?). Il est en effet capable d'infecter des tubercules de pomme de terre au champ (Ciampi et al. 1980), mais aussi sur rhizomes d'*Heliconia*, d'*anthurium* et gingembre (Hayward 1994) ; il peut survivre 4 à 6 mois dans des tubercules stockés à 4°C (Milling et al. 2009). **Il est donc urgent de réactiver les mesures de quarantaine internationale et d'épidémiosurveillance**

sur ce phylotype, au lieu de les focaliser uniquement sur l'écotype « Brown Rot » (IIB-sequevar 1).

Le **phylotype II** est très probablement originaire du bassin Amazonien, dans l'actuel Brésil. Il s'est par la suite subdivisé en phylotype IIA et IIB, à une période contemporaine de la différenciation I-III (Figure 17). Il est étonnant d'observer un tel contraste entre IIA recombino-gène et IIB clonal ; par ailleurs les généalogies portent les signatures d'une expansion démographique significative mais moins rapide que les I et III. Le phylotype IIB, prédit majoritairement d'Amérique Latine Australe, a ensuite envahi le monde très récemment, probablement via des tubercules de pomme de terre contaminées et boutures d'espèces ornementales et de bananier.

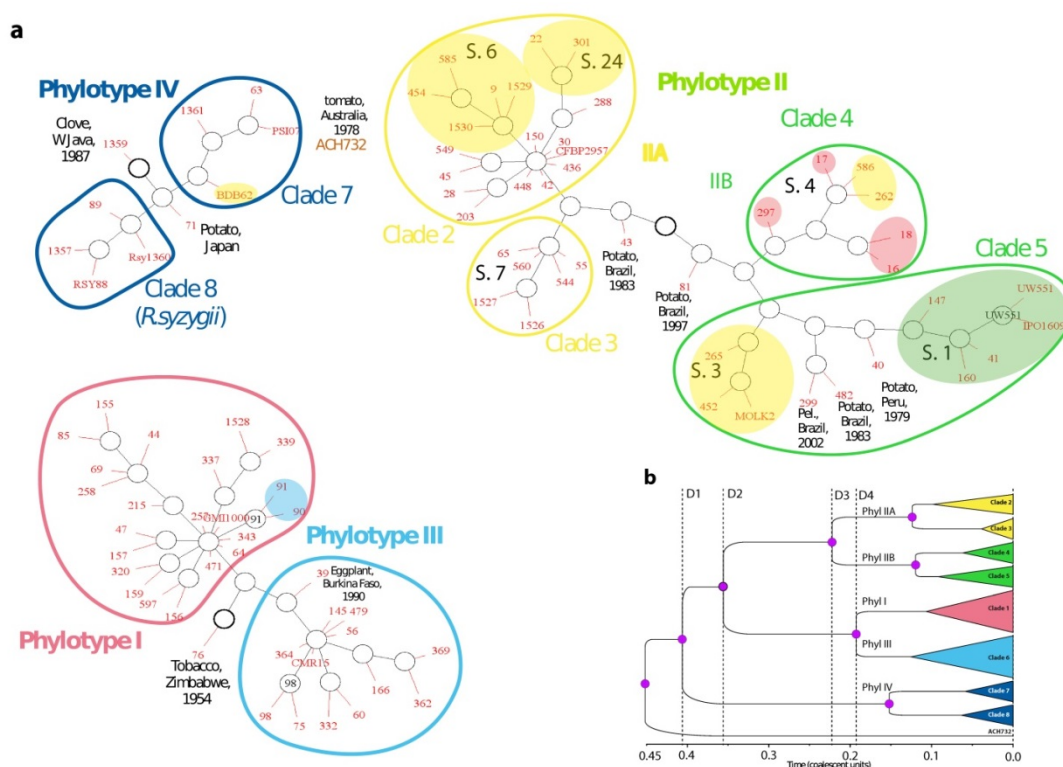


Figure 17. Généalogies de gènes des phylotypes et clades de *Ralstonia solanacearum*. **(a)** Réseau GraphViz généré par ClonalFrame. Les nœuds ancestraux sont marqués en noir, les isolats en rouge. Le nœud ancestral de chaque réseau est figuré par un cercle plus épais. Les souches sont désignées par leur n° RUN. **En jaune**, les écotypes infectant le bananier : Moko (IIA/sequevars 6 et 24 ; IIB/ Sequevars 3 et 4) et BDB (IV/sequevar 10) ; **en vert**, l'écotype « Brown Rot » (IIB/sequevar 1, anciennement race 3/biovar 2), préférentiellement pathogène sur pomme de terre et tomate, et spécifiquement capables d'attaquer à températures fraîches ; **en rouge**, l'écotype « émergent » (cf. plus haut). **En bleu**, les souches affectant le mûrier (race 5/biovar 5). S., sequevars egl. Les outliers sont

identifiés par leur N°RUN, leur hôte, pays et année d'isolement ; Pel. *Pelargonium* sp. **(b)** Arbre « majority-rule » basé sur la distribution postérieure des généalogies inférées par ClonalFrame, montrant les 8 clades. D1, divergence entre phylotype IV et I/II/III ; D2, divergence entre phylotype II et I/III ; D3, divergence entre IIA et IIB ; D4, divergence entre phylotypes I et III.

Les écotypes ne sont pas phylogénétiquement supportés

Il est frappant de constater que les clades du phylotype IIA et IV renferment des souches phénotypiquement très différentes (Figure 17A). L'écotype Moko en particulier, est très clairement polyphylétique, ce qui suggère que le pouvoir pathogène sur bananier réside sur un nombre très restreint de gènes, voire de formes alléliques du même gène. Globalement, cela suggère que la préférence d'hôte n'est pas une force évolutive structurante des écotypes.

Conclusion : RSSC est recombinogène, et le phylotype I possède le potentiel évolutif le plus élevé

Cette étude a donc mis en évidence quelques avancées majeures dans la connaissance de l'histoire évolutive du RSSC, mais suscite tout autant de questions.

Il apparaît en effet que sous le RSSC coexistent 3 grands groupes à la dynamique évolutive assez spécifique :

- Phylotype IV très recombinogène mais pas en expansion, et d'ailleurs de prévalence limitée à l'Indonésie, et certaines zones ponctuelles aux Philippines, Japon, Inde. La fitness de ce groupe est très mal connue, mais supposée faible -des prospections sur solanacées maraîchères à Java et Bornéo, en zone endémique du phylotype IV, n'ont permis de collecter que du phylotype I (collection SEMINIS 2003)-.
- Phylotype I et III, très recombinogènes, en expansion ; toutefois seul le phylotype I est pandémique
- Phylotype IIA et IIB, peu à pas recombinogène, en faible expansion.

Ces trois groupes correspondent en fait aux trois espèces génomiques proposées par (Remenant et al. 2010, Remenant et al. 2011), mais le niveau de flux de gènes inter-phylotype observé sur ces 9 gènes - confirmé plus tard à l'échelle génomique (Lefeuvre et al. 2013)- souligne que la spéciation en 3 espèces écologiques n'est pas achevée, peut-être suite aux échanges commerciaux qui ont multiplié les situations où différents phylotypes coexistent en sympatrie.

Les niveaux de recombinaison estimés chez les phylotype I, III et IV sont très élevés par rapport aux quelques données existant sur les bactéries phytopathogènes, avec des r/m oscillant entre 1.5 sur *Pseudomonas syringae* (Sarkar and Guttman 2004) et 6.5 sur *Xanthomonas campestris* (Fargier et al. 2011). Des valeurs hautes (r/m moyen de 18.516) ont récemment été publiées sur *Xanthomonas euvesicatoria* et *X.vesicatoria*, pathogène de la tomate et du piment (Timilsina et al. 2015).

En considérant les paramètres proposés par McDonald et Linde (2002) pour définir le potentiel évolutif, notamment le mode de reproduction, l'histoire démographique (qui traduit un potentiel de dissémination), il apparaît que le phylotype I est clairement doté du potentiel le plus élevé (Figure 18), bien avant l'autre phylotype pandémique, le IIB. Il a par ailleurs le spectre de virulence le plus large (6 pathoprofils). Ce constat est une réelle nouveauté, alors que l'on considérait que le risque d'émergence concernait davantage le phylotype IIB.

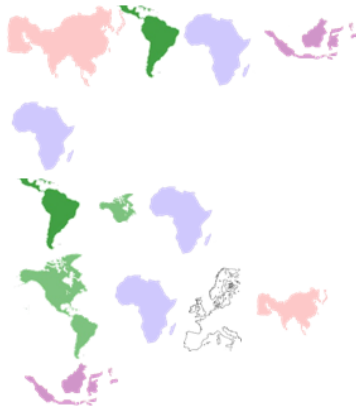
| Phylo type | Taux de mutation | Mode de reproduction | Démographie | Pathoprofils (Lebeau <i>et al</i> 2011) (N'Guessan <i>et al</i> 2012) | Prévalence |
|------------|------------------|--------------------------|------------------|---|---|
| I | 137.6 | Hautement recombino-gène | Forte expansion | A, B, C, D, E, F |  |
| III | 68.8 | Hautement recombino-gène | Expansion | B, C, E | |
| IIA | 49.4 | Recombino-gène | Expansion | C | |
| IIB | 43.3 | Clonal | Faible expansion | E, F | |
| IV | 108.2 | Hautement recombino-gène | Equilibre | ND | |

Figure 18. Synthèse des composantes du potentiel évolutif de chaque phylotype, avec leurs profils de virulence sur Solanacées (pathoprofils) et leur prévalence mondiale

C'est donc sur le phylotype I, le plus potentiellement apte à s'adapter à un nouvel hôte ou à une nouvelle résistance, que nous avons alors axé nos travaux d'épidémiosurveillance et de biologie évolutive.

Ce projet a impliqué un post-doctorant (JC De Cambiaire), et donné lieu à une publication de rang A.

Wicker E., Lefeuvre P., De Cambiaire J.C, Lemaire C., Poussier S., Prior P. 2012.

Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME Journal*, **6** : 961-974. [IF: 8.951 ; NC : 22]

5.5 L'ennemi public phylotype I- comment le cerner à plusieurs échelles

Après avoir évalué le potentiel évolutif des différents phylotypes, et identifié le phylotype I comme groupe à contrôler en priorité, nous avons poursuivi deux principaux objectifs :

- Mieux cerner la variabilité génotypique du phylotype I existant à l'échelle mondiale
- Caractériser sa dynamique de population sur des échelles de temps et d'espace plus petites, et notamment estimer différents paramètres de génétique des populations

Pour atteindre le premier objectif, nous avons mis à profit une base de données des séquences partielles *egl* et *mutS*, tandis que le 2^{ème} objectif nous a conduit à développer des marqueurs à horloge moléculaire rapide (schémas MLVA) et à suivre une approche d'épidémiologie moléculaire.

5.5.1 Mieux connaître la variabilité mondiale (génotypage *egl-mutS*)

Alors que de nombreux sites web sont disponibles pour l'épidémiosurveillance des bactéries d'intérêt médical (<http://pubmlst.org/databases/>, <http://www.mlst.net>, <http://bigsdbs.web.pasteur.fr>, ...), il n'existe malheureusement pas actuellement de site web ou de base de données internationale permettant de faire de l'épidémio-surveillance de *Ralstonia solanacearum*; seul le site PAMDB (Almeida et al. 2010) (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) propose un nombre limité de séquençotypes de *R.solanacearum*. Suite notamment aux travaux menés en Afrique (Mahbou Somo Toukam et al. 2009, N'Guessan 2013, N'Guessan et al. 2012) et en Amérique du Sud (Deberdt et al. 2014, Siri et al. 2011), thèse A. MUHAMAD), nous avons pu alimenter une base de données locale de séquences *egl* et *mutS* (base RUN-Ralstonia, créée par P. PRIOR).

Pour juger de la représentativité de notre base de données de 1341 souches, nous l'avons comparé avec la base des Organismes de Quarantaine de l'OEPP (EPPQ 2015). Sur les 112 pays où *R.solanacearum* est déclaré « présent » par l'OEPP, 57 n'apparaissent pas dans notre base (16 d'Afrique, 11 d'Asie et Océanie, 10 d'Europe, 5 d'Amérique du Sud, 4 d'Amérique Centrale). En revanche nous avons des séquences de 5 pays où la maladie est déclarée absente : Finlande, Haïti, Puerto-Rico, Seychelles, Espagne.

Pour classer nos souches, nous avons utilisé la nomenclature phylotype-séquovar, mais nous sommes aperçus que l'assignation à un séquovar unique était parfois difficile, à cause de l'arbitraire du seuil de 1% de dissimilarité. Nous avons préféré nous orienter sur le système

des séquençotypes (Sequence Types ou ST), plus communément utilisé en microbiologie animale et médicale.

A ce jour, 126 egl-ST (eST) et 122 mutS-ST (mST) ont donc été décrits, et doivent être déposés dès que possible sur PAMDB et Genbank. Le phylotype I compte 44 eST et 49 mST. L'Asie est clairement la région la plus diversifiée (27 ST), suivie de l'Afrique (14), l'Océan Indien (5), l'Amérique du Sud (4), les Antilles (3). Curieusement nous n'avons trouvé qu'un ST pandémique (eST60, celui de GMI1000 (Salanoubat et al. 2002)). Point intéressant : sur les 12 eST non trouvés en Asie, huit sont spécifiques à l'Afrique (eST064-066, 68, 94, 95, 122, 123) ; un (eST028) est retrouvé en Afrique, Antilles, Océan Indien; et trois sont spécifiques à l'Amérique du Sud, Guyane plus précisément (eST080), Antilles (eST108), Australie (eST040).

5.5.2 Des marqueurs pour l'épidémiologie moléculaire : les MLVA

Pour avoir accès aux différents paramètres de génétique de populations évoqués plus haut (richesses alléliques, taille efficace, flux de gènes,...), nous avons développé un schéma d'analyse VNTR multilocus (MLVA) en profitant de la disponibilité de 6 séquences génomiques générées par les équipes de P. Prior et C. Boucher (GMI1000, phylotype I ; CMR15, phylotype III ; CFBP2957, IIA ; IPO1609 et MOLK2, IIB ; PSI07, phylotype IV). Nous avons initialement l'intention de développer un schéma englobant les 4 phylotypes, mais n'avons trouvé que 3 loci communs sur les 26 loci polymorphes identifiés (taille des motifs de 6 à 33 nucléotides) (Figure 19). Cet état de fait s'explique aisément par la variabilité génomique existant chez *R.solanacearum*. Alors que la MLVA est considérée comme particulièrement adaptée aux groupes ou espèces bactériennes partageant plus de 98% de similarité de séquence (Grissa et al. 2008), phylotypes I et III ne partagent « que » 96–96.3% d'identité nucléotidique moyenne (ANI), et seulement 90.9–91.2% avec le phylotype II et le phylotype IV (Remenant et al. 2010); IIA and IIB partagent 96.1%, tandis que les génomes IIB sont plus homogènes (98.4% ANI). Nous avons donc été amenés à dessiner plutôt 4 MLVA phylotype-spécifiques (N'Guessan et al. 2013):

- un schéma Phylotype 1 à 13 loci (appelé également MLVA13) et un schéma Phylotype III à 11 loci (MLVA11), partageant 10 loci communs
- un schéma Phylotype II à 12 loci
- un schéma Phylotype IV à 6 loci, qui doit cependant être considéré comme provisoire vu le peu de connaissances disponibles sur la diversité génétique de cette lignée évolutive

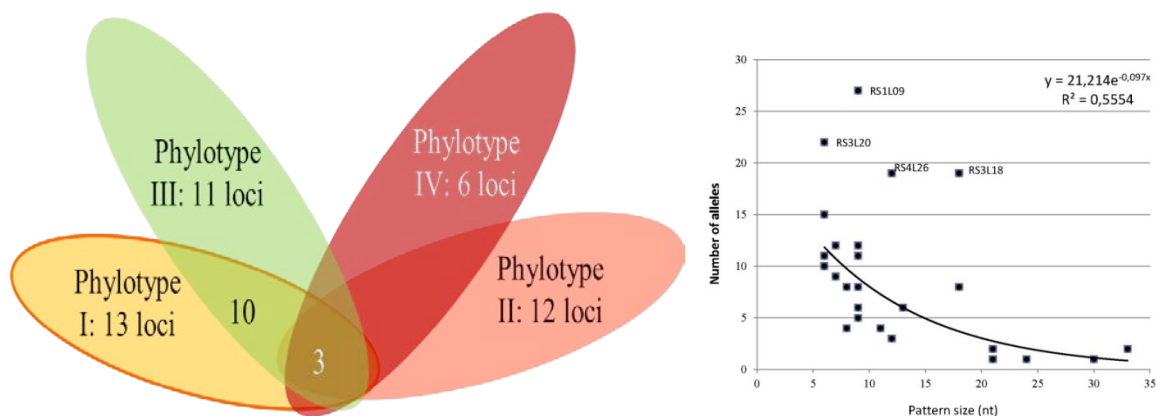


Figure 19. Récapitulatif des schémas MLVA développés sur *R.solanacearum* (N'Guessan et al. 2013), et relation entre la taille du motif et le nombre d'allèles observés.

Sur les 337 souches génotypées, 182 haplotypes MLVA ont été identifiés (95 dans le phylotype I, 28 dans le phylotype IIA, 21 dans le phylotype IIB, 30 dans le phylotype III, et 8 dans le phylotype IV). La plupart des loci (22 sur 26) suivent le modèle de mutation pas-à-pas (SMM), ce qui en fait des marqueurs de choix pour l'analyse de la structuration génétique des populations.

Ces marqueurs ont par ailleurs un pouvoir discriminant particulièrement intéressant pour étudier les épidémies provoquées par les écotypes très monomorphes, comme l'écotype « brown rot » (IIB/clade 5/sequence 1, eST010) : dans ce seul egl-ST, 10 haplotypes MLVA ont été identifiés.

5.5.3 L'Afrique, lieu de diversité insoupçonnée

Nous avons ensuite utilisé ces marqueurs MLVA pour génotyper une collection régionale et internationale de phylotype I (201 souches), originaire d'Afrique (Côte d'Ivoire notamment), mais aussi Amérique et Asie (N'Guessan 2013). Dans le cadre de la thèse de C. N'GUESSAN qui avait pour objectif premier de caractériser les populations de *R.solanacearum* de Côte d'Ivoire, nous avons positionné les populations ivoiriennes dans la diversité génétique Africaine et Mondiale. Nous avons suivi la même stratégie d'analyse pour les populations de phylotype I, IIA, et III : construction de réseaux d'haplotypes par la méthode E-BURST, clustering Bayésien sous le modèle « linkage » (STRUCTURE (Hubisz et al. 2009, Pritchard et al. 2000)), Analyse Discriminante des Composantes Principales (Jombart et al. 2010), estimations des richesses alléliques et privées sur les populations issues d'un même pays.

Dans le cas du phylotype I, nous nous sommes aperçus que parmi les 11 complexes clonaux (groupes d'haplotypes différant par un seul locus (Single-Locus Variants, SLV)) et 23

singletons identifiés au niveau mondial, quatre étaient spécifiques de l'Afrique, et cinq étaient spécifiques à la seule Côte d'Ivoire. Une Analyse Discriminante des Composantes Principale confirme d'ailleurs ces résultats (Figure 20).

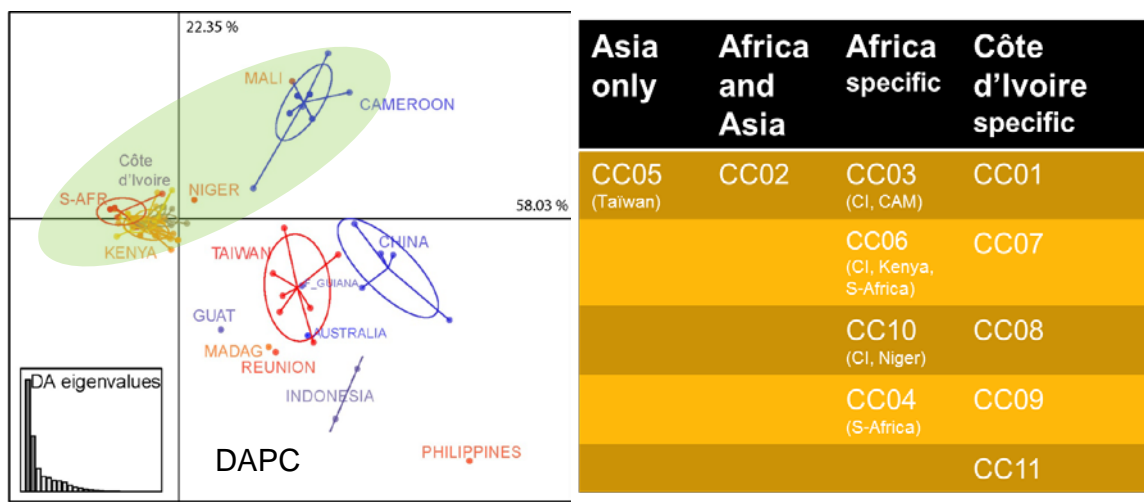
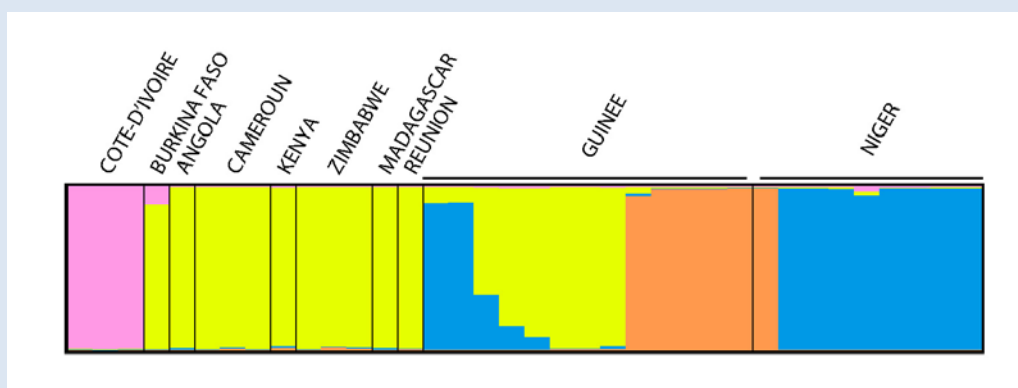


Figure 20. Originalité des populations Africaines de phylotype I mises en évidence par MLVA-13 (N'Guessan et al. 2014). **Gauche** : Analyse Discriminante des Composantes Principales (Jombart et al. 2010) ; S-AFR : Afrique du Sud, GUAT : Guatemala, MADAG : Madagascar. **Droite** : Spécificité géographique des 11 complexes clonaux (CC) identifiés par l’analyse E-BURST (Feil et al. 2004, Spratt et al. 2004)

Les MLVA révèlent aussi une diversité insoupçonnée dans le phylotype III.

Le phylotype III se distingue par une forte diversité (30 haplotypes parmi 36 souches), avec seulement 3 complexes clonaux et 22 singletons. D'après le clustering Bayésien, quatre populations ancestrales sont identifiées : (i) une population dominante trouvée en Afrique australe et de l'Est, Océan Indien, Afrique Centrale ; (ii) une population majoritaire au Niger et retrouvée en Guinée ; (iii) une population endémique de Guinée ; (iv) une population échantillonnée en Côte d'Ivoire, faiblement apparentée au Burkina Faso (souche ancestrale RUN0039, Figure 17). Il semble donc que la Côte d'Ivoire renferme une population particulière, peut-être ancestrale. Une population ancienne semble aussi exister en Guinée rayonnant vers le Niger, peut-être via les échanges commerciaux de tubercules de pomme de terre.



5.5.4 Structuration des populations à l'échelle d'un pays : le cas de la Côte d'Ivoire

Les populations de Côte d'Ivoire, plus exactement du Sud et Centre Côte d'Ivoire (les prospections ont été menées en 2010-2011, lors de la partition du pays), ont une composition originale par rapport à ce que l'on connaissait de la diversité africaine. Le schéma communément admis depuis l'étude de Mahbou et al. (2009), considérait une prédominance du phylotype I et plus secondairement du IIA en plaine, tandis que le phylotype IIB-1 (« American brown rot ») et le phylotype III (« African brown rot ») dominaient les zones plus élevées. En Côte d'Ivoire, les populations prédominantes sont en fait de phylotype I (87.5 %), y compris dans les zones d'altitude (Ouest du pays, à Man et Souandala), tandis qu'aucune souche IIB-1 n'a été collectée, et que très peu de phylotype III a pu être échantillonné (N'Guessan et al. 2012).

Cette situation nous a amené à estimer la diversité et structuration génétique des populations ivoiriennes. Nous avons spécifiquement cherché à savoir si la diversité génétique était géographiquement structurée, notamment pour tenter de retracer les flux de gènes et routes de dissémination. A cet effet, nous avons comparé les populations issues de 7 localités différentes (10 à 28 isolats par localité), sur différents paramètres et analyses : diversité génétique (H de Nei), richesses alléliques totale et privée, différenciation évaluée par le F_{st} et le R_{st} , clustering Bayésien (STRUCTURE) et DAPC (Jombart et al. 2010). Nous avons aussi mesuré le niveau de déséquilibre de liaison (DL) multilocus par l'index d'association (Agapow and Burt 2001) calculé sous MultiLocus ; toutes les populations de localités présentaient un DL très significatif mis à part « Attobro ».

Ralstonia solanacearum étant un pathogène tellurique sans moyen de dissémination actif, il était supposé que les populations étaient géographiquement structurées, et donc que les populations les plus distantes seraient également les plus génétiquement différenciées. Or les analyses pratiquées n'ont montré aucun isolement par la distance (Isolation-By-Distance, IBD) significatif, suggérant que les populations échangent en fait de nombreux allèles. On ne peut également exclure que cette absence d'IBD soit liée à une haute taille efficace de population (N_e).

Flux de gènes entre populations : deux routes de dissémination ?

Collectivement, les différents résultats ont permis d'inférer les possibles relations génétiques entre populations (Figure 21). La population de Bassam (Sud-Est) apparaît originale, significativement différenciée de toutes les autres. Au vu de leurs richesses alléliques totales et privées, Yamoussoukro et Sinfra semblent être des populations assez anciennes. Songon semble être une population-carrefour (richesses alléliques plus faibles), qui a reçu des allèles de Yamoussoukro et en a probablement envoyé vers Daloa et Man. Souandala, Kondoukro, Datta sont un autre ensemble de localités ayant expérimenté des flux de gènes réguliers ; leurs faibles richesses alléliques suggèrent des populations non endémiques, peut-être introduites depuis un pays étranger. Leur composition allélique les apparente d'ailleurs à des populations du Cameroun.

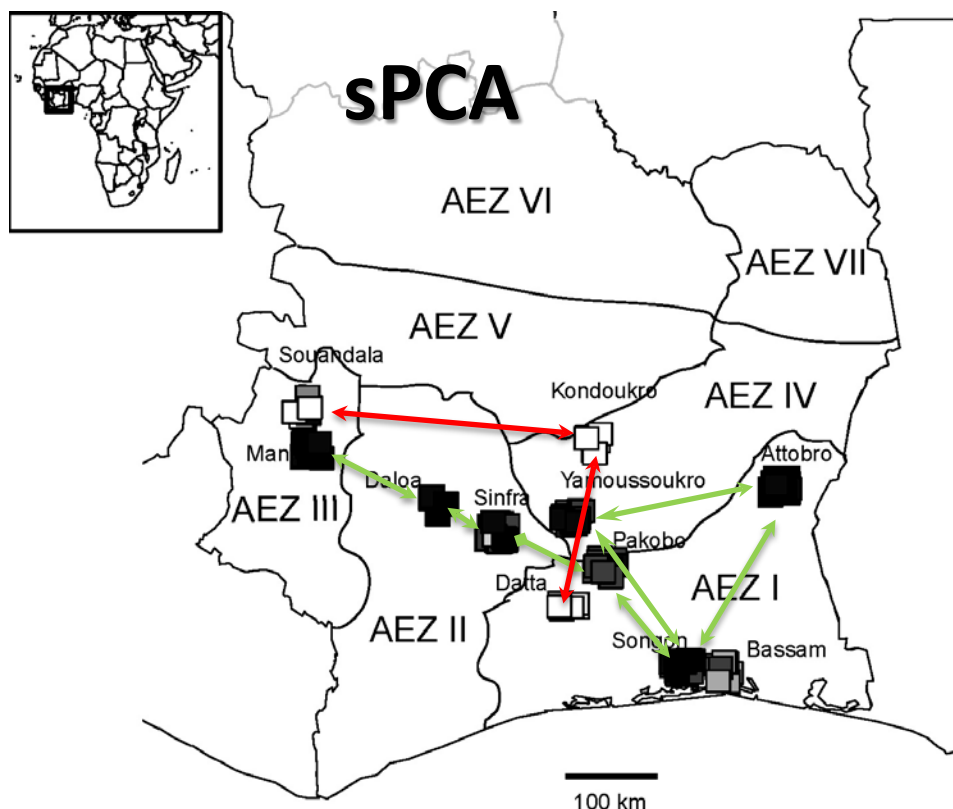


Figure 21. Cartographie des populations de localités collectées en Côte d'Ivoire, et flux possibles de gènes inférés d'après les estimateurs de génétiques de populations, et Analyse spatialisée des Composantes Principales (sPCA (Jombart et al. 2008))

Pour orienter les flux de gènes et reconstruire les routes d'invasion, deux scénarios pourraient être testés par inférence bayésienne ABC : (i) une population ancestrale venue de Yamoussoukro ayant colonisé Songon, puis Sinfra ; (ii) une population non échantillonnée, après admixture avec Songon, aurait donné la population de Yamoussoukro.

Le complexe clonal CC06 rassemble des souches à spectre de virulence large

Le phénotypage de 25 souches (19 phylotype I) représentatives sur la CORETEP2 (Lebeau 2010, N'Guessan 2013, N'Guessan et al. 2012), nous a permis d'évaluer la corrélation entre haplotypes MLVA et complexes clonaux et spectres de virulence sur Solanacées. Nous avons ainsi mis en évidence plusieurs associations complexe clonal-virulence : (i) le CC06 (et plus précisément les haplotypes HI04, HI05, HI06), semble présenter un spectre large de virulence et une forte agressivité, les 6 souches testées montrant un pathoprofil D, E, ou F ! Ce fut d'ailleurs la première description de virulences aussi fortes chez le phylotype I (N'Guessan et

al. 2012) ; (ii) les CC02, CC08, CC11, à l’opposé, ont un spectre de virulence beaucoup plus restreint (pathoprofils C (n=4), A (n=2), B (n=1)). Ces 3 derniers CC présentent une diversité génétique supérieure (H de Nei respectifs de 0.155, 0.174, 0.131) à celle observée dans le CC06 (H=0.055).

Le CC06, également détecté en Afrique du Sud et au Kenya, est l’un des deux CC les plus répandus en Côte d’Ivoire, présent dans 6 localités (Attobro, Songon, Daloa, Sinfra, Man, et Yamoussoukro ; carrés noirs sur la figure 21) ; le CC02 occupe aussi 6 localités (Angededou, Bassam, Datta, Kondoukro, Sinfra, Souandala ; carrés blancs sur la figure 21).

Une analyse préliminaire des séquences partielles d’effecteurs de type III (en considérant uniquement *ripP1*, *ripP2*, *ripAX2* et *ripN*), semble montrer une corrélation entre CC et ce répertoire restreint (Figure 22). L’analyse de la distribution de nos 10 effecteurs candidats dans les différents CC, est actuellement en cours.

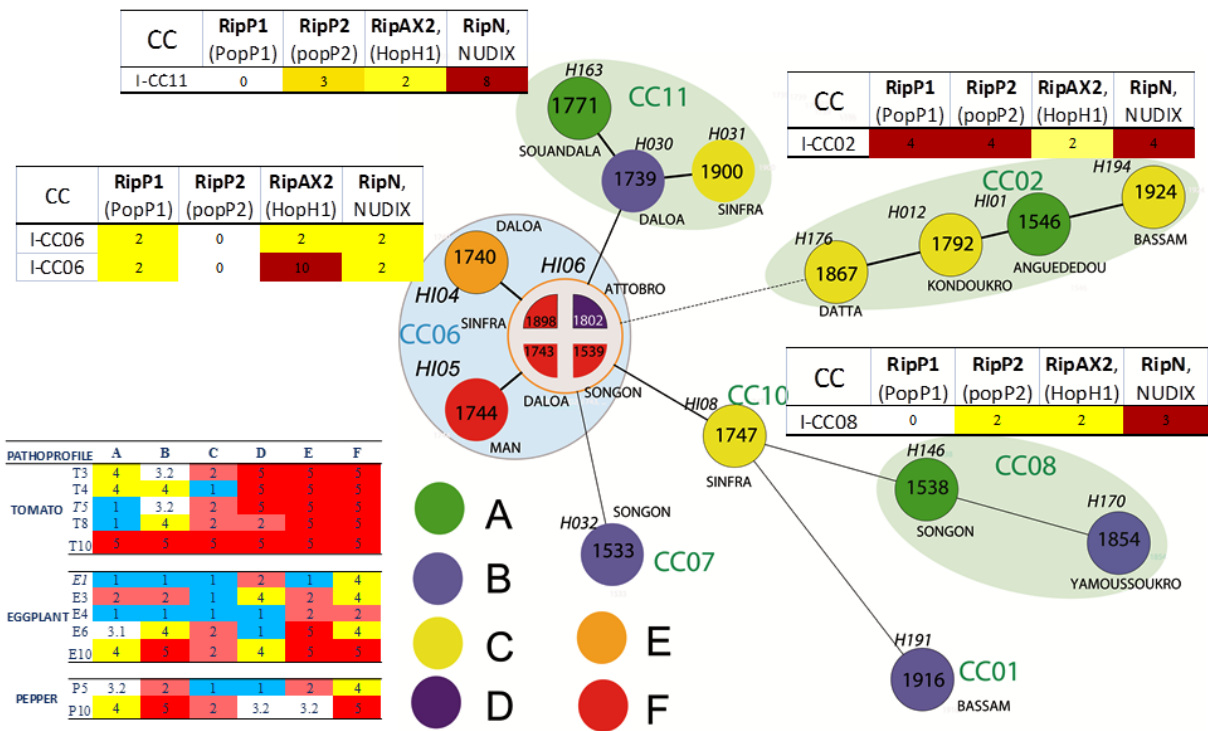


Figure 22. Complexes clonaux, pathoprofils et phénotypes correspondants sur tomate-aubergine-piment, et répertoires restreints d’effecteurs de type III (0 : absence ; les chiffres désignent des numéros d’allèles). Arbre à recouvrement minimal basé sur la distance de Manhattan.

Grâce à ces travaux, nous avons pu proposer une carte des virulences présentes sur tomate et aubergine, et proposer ainsi une stratégie nationale de déploiement des résistances

(N'Guessan 2013, N'Guessan et al. 2012). A titre d'exemple, aucune source de résistance n'est adaptée à la région de Man, et nous avons conseillé de développer une stratégie de rotations assainissantes.

Le CC06 a été identifié également au Kenya et Afrique du Sud, et il reste à déterminer s'il constitue un groupe émergent dans toute l'Afrique, si son profil de virulence est aussi homogène que celui observé en Côte d'Ivoire, si sa fitness est supérieure à celle des autres groupes.

Cette étude nous a permis également d'obtenir les premiers paramètres de diversité génétique des populations de *Ralstonia solanacearum*. La diversité globale mesurée sur la Côte d'Ivoire (estimée par le H de Nei) est de 0.396, avec des diversités par localité s'échelonnant entre 0.032 (Attobro) et 0.367 (Yamoussoukro). Peu de comparaisons sont malheureusement disponibles dans la littérature, les MLVA étant surtout considérés comme un outil de traçage d'haplotypes. *Xanthomonas citri*, d'épidémiologie aérienne, présente des valeurs plus élevées en zone d'endémisme (0.738 au Vietnam (Verniere et al. 2014)), mais similaires en zone d'émergence (0.251 au Burkina, 0.379 au Mali (Leduc et al. 2015)). *Xylella fastidiosa*, bactériose aérienne transmise par vecteur, présente des valeurs légèrement plus basses à l'échelle régionale sur *Citrus sinensis* (entre 0.024 et 0.285 sur 5 régions du Brésil (Coletta-Filho and Machado 2003)). *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien sur pommier, présente une diversité de 0.325 en Slovénie (Buhlmann et al. 2014)

Ces travaux ont fait l'objet de la thèse de Aya Carine N'Guessan, et ont donné lieu à deux publications de rang A ; une autre publication présentant l'analyse de populations est en préparation.

N'Guessan A.C., Abo K., Fondio L., Chiroleu F., Lebeau A., Poussier S., Wicker E*, Koné D*. 2012. So near and yet so far: The specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Côte d'Ivoire in Africa. *Phytopathology*, **102** (8) : 733-740. [IF: 2.968 ; NC : 2] *co-dernier auteurs

N'Guessan C.A., Brisse S., Le Roux-Nio A.C., Poussier S., Koné D., Wicker E. 2013. Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of microbiological methods*, **92** (3) : 366-374. [IF: 2.096 ; NC : 8]

5.5.5 Comment une population parcellaire s'adapte à la résistance de l'aubergine AG91-25 (ou pas.....)

La résistance d'AG91-25 est conférée par le locus majeur *Ers1* (Lebeau et al. 2013), très efficace contre le phylotype I. Cependant les caractérisations de population menés dans notre équipe ont montré la préexistence dans la nature de souches virulentes sur AG91-25, à Taïwan et en Indonésie (Lebeau 2010), Côte d'Ivoire (N'Guessan et al. 2012), Guyane française (Deberdt et al. 2014). Nous avons donc voulu cerner les mécanismes moléculaires et populationnels en jeu dans l'adaptation d'une population naturelle de *R.solanacearum* à la culture de l'aubergine, et notamment au contournement de la résistance d'AG91-25 (codée E6 dans la suite du document). Notre site d'étude est une parcelle expérimentale de la Station de Ligne Paradis (St Pierre, Réunion) sur laquelle ont été observés des symptômes de flétrissement depuis les années 1990 (Poussier 2000). La caractérisation phylogénétique menée en 2009 (C. N'Guessan, données non publiées) avait conclu à la présence exclusive du phylotype I, et des symptômes de flétrissement avaient été observés sur E6. Ce site avait donc toutes les potentialités pour provoquer expérimentalement un contournement de la résistance d'E6.

Nous avons lancé un projet d'évolution expérimentale *in situ*, pour répondre à plusieurs questions :

- La pression de sélection de l'hôte résistant impacte-t-elle la diversité et la structuration génétique de la population, ou plutôt la taille de la population infectieuse ?
- L'hôte résistant provoque-t-il l'apparition de nouveaux variants (haplotypes nouveaux) ou sélectionne-t-il/favorise-t-il des haplotypes présents, mieux adaptés ?
- Quel est le lieu privilégié de la sélection : avant la pénétration dans la plante ou lors de la migration des bactéries dans le xylème ? Pour quantifier cela, des isollements microbiologiques ont été menés (i) sur rhizosphère, et (ii) dans la tige (vaisseaux du xylème)
- La résistance de l'hôte a-t-elle un impact sur la taille efficace de la population ?
- Nous avons fait l'hypothèse qu'un contournement rapide pouvait arriver s'il y avait apparition de virulents ET dissémination rapide de ces nouveaux variants aux proches voisins. L'épidémie se propage-t-elle par diffusion ?

En 2012, nous avons préalablement multiplié l'inoculum présent dans la parcelle par une culture de tomate sensible (cycle 0), qui nous a permis d'évaluer l'hétérogénéité d'infestation et en cartographier les foyers. Suite à cette cartographie, nous avons placé dans les principaux foyers trois couples de parcelle (52 plants chacune) d'aubergine sensible (MM738, ou E8)/résistante (AG91-25, ou E6) sur lesquelles ont été menées 5 cycles successifs de

monoculture de 3 mois, chaque plant étant précisément localisé par un code Lettre-Chiffre (Ligne-Colonne). Sur chaque parcelle, les incidences de maladie ont été suivies ; pour les isolements bactériens de plante flétrie, les échantillonnages étaient limités à un double W sur chaque parcelle, tandis que sur les plants sans symptôme, des isolements systématiques étaient menés en fin de cycle de culture.

La nécessité de nouveaux marqueurs MLVA

Les premiers génotypages menés sur la parcelle avec le MLVA-13 de N'Guessan et al. (2013) ont révélé un polymorphisme trop faible à cette échelle (un locus polymorphe, trois allèles). A l'aide des données génomiques sur 2 souches de phylotype I (GMI1000, Y45) et III (CMR15), nous avons donc développé un nouveau schéma MLVA spécifique au phylotype I comprenant 8 loci de tailles exclusivement comprises entre 6 et 9 nt, spécifiques du complexe d'espèces *R.solanacearum* et du phylotype I. Le pouvoir discriminant a été confirmé sur plusieurs collections de parcelle de la Réunion et de sol de Martinique (Guinard et al. 2015).

E6 a une résistance plus durable qu'attendu, avec un possible effet suppressif sur la population du sol

Nous n'avons observé aucun flétrissement au cours des différents cycles de culture d'E6, et des infections latentes n'ont été isolées qu'au premier cycle. Au cycle 1, 71 souches de *R.solanacearum* phylotype I ont été isolées d'E6. D'après différents estimateurs de diversité génétique (Fst et Rst, AMOVA), la variété de l'hôte n'est pas un facteur structurant la variabilité génétique des populations (P= 0.9 NS). Si la diversité génétique et haplotypique des populations infectant E6 est bien moindre que celle trouvée sur E8, les deux accessions piègent les mêmes haplotypes MLVA.

Par la suite, plus aucune infection latente n'a pu être détectée sur E6. Au cycle 2, **103 colonies** « suspectes », morphologiquement très proches de *Ralstonia solanacearum*, avaient été isolées. Elles se sont révélées appartenir soit au genre *Bosea* (alpha-protéobactérie, Bradyrhizobiaceae vivant dans la rhizosphère et nodules de Légumineuses), soit au genre *Inquilinus* (alpha-protéobactérie rhizosphérique, parfois nosocomiale, de la famille des Rhodospirillaceae). La question du rôle de ces espèces isolées des vaisseaux du xylème, notamment de leur implication possible dans la résistance à l'infection par *R.solanacearum*, reste posée.

Lors du cycle 5, des échantillonnages de sol sur les localisations E6 où nous avons observé des infections latentes au cycle 1, ont révélé des niveaux de population cultivable très bas (aucune bactérie isolée dans 4 prélèvements sur 13 ; moyenne des 9 autres prélèvements : $\text{Log } 1.03 \cdot \text{g sol}^{-1}$), alors que ceux relevés sur le témoin E8 sont supérieurs d'au moins un degré de magnitude (moyenne : $\text{Log } 2.45 \cdot \text{g sol}^{-1}$). Ces résultats nous mènent à l'hypothèse que la résistance de E6 s'exprime peut-être par des composés bactériostatiques ou bactéricides émis dans les exsudats racinaires, qui font chuter le niveau de population pathogène jusqu'à empêcher toute infection latente, mais aussi empêcher toute apparition d'un quelconque variant virulent. Ce type de résistance a déjà été décrit chez *Arabidopsis thaliana* (Bais et al. 2005) pour contrôler *Pseudomonas syringae*.

Les aubergines testées ne présentent pas un « effet-filtre » détectable

Les populations prélevées dans la rhizosphère et dans les tiges n'étaient pas significativement différentes, bien qu'une chute de diversité haplotypique ait été observée sur certains couples. De plus, les analyses de variance moléculaire n'ont pas montré d'effet prépondérant de l'habitat sur la structuration des populations. A partir du cycle 2, nous avons donc isolé des tissus du xylème.

La succession de cycles d'aubergine sensible induit une accélération de la progression de maladie

Les incidences maximales (phase plateau en fin de cycle) sont plus faibles au cycle 1 (24 à 40% de plantes flétries à l'issue de 84 JAP), aux cycles suivants (100% d'incidence pour le cycle 2 (72 JAP), le cycle 3 (70 JAP) et le cycle 4 (84 JAP)).

Cette forte progression de maladie entre les cycles n'est pas corrélée avec les conditions de température et pluviométrie de la parcelle ; elle est probablement davantage liée à l'augmentation constante de la pression d'inoculum dans la parcelle.

L'adaptation des populations à l'aubergine sensible E8 se traduit par une diminution de diversité et l'apparition de nouveaux génotypes

On constate une nette diminution de la diversité génétique entre cycle 1 ($H_E=0.298$) et cycle 2 ($H_E=0.149$), accompagnée de l'apparition de nouveaux haplotypes à partir du cycle 2 (Figure 23), et l'augmentation en fréquence de deux haplotypes principaux. Ces tendances, confirmées au cycle 4, évoquent un phénomène d'adaptation locale en cours. De façon intéressante, ce phénomène est observé sur chacune des 3 parcelles E8.

Nous avons voulu savoir si cette adaptation locale se traduisait par un gain d'agressivité des souches au cours des différents cycles. Des inoculations de souches Cycle 1 et Cycle 2 sur E8 n'ont montré aucun gain significatif, les souches du Cycle 2 étant même légèrement moins agressives.

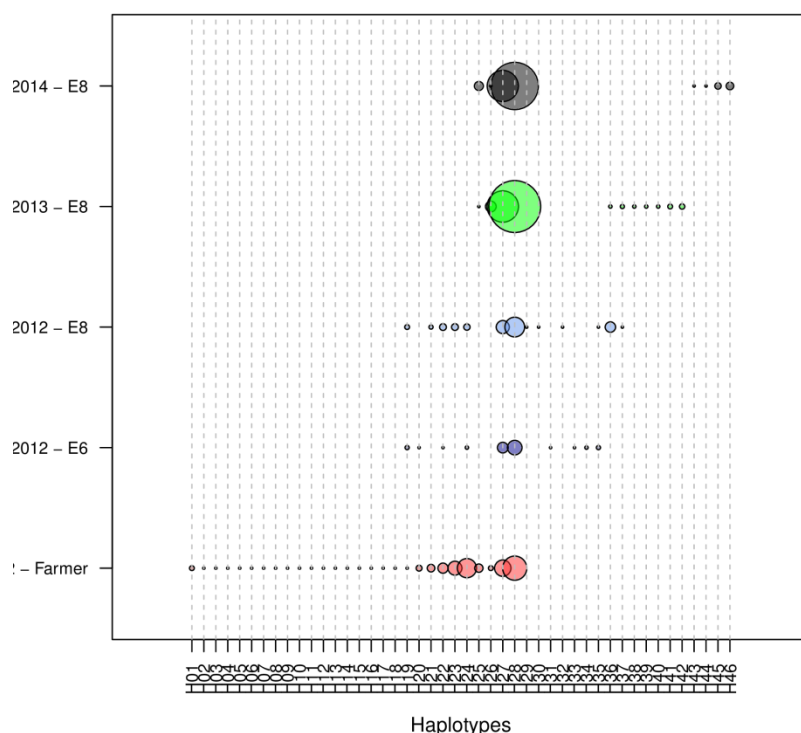


Figure 23. Diversité des haplotypes MLVA sur la parcelle du Vallon, sur tomate au cours du cycle 0 (« Farmer »), sur E8 au cours des cycles 1 (« 2012-E8 »), 2 (« 2013-E8 »), 4 (« 2014-E8 »), et sur E6 au cycle 1 (« 2012-E6 »).

Nous avons aussi testé l'hypothèse que les souches d'infections latentes sur E6 avaient, par compensation, perdu en agressivité sur E8 (trade-off). Les inoculations de telles souches sur E6 et E8 ont complètement infirmé cette idée, les souches E6 se montrant plus agressives sur E8 que les souches isolées d'E8. Ces résultats suggèrent plutôt que la pression de sélection de E6 aurait provoqué un gain d'agressivité général chez les populations de *R.solanacearum* pour réussir l'infection ; un tel phénomène évoque le gain d'agressivité sélectionné par une résistance quantitative, déjà observé sur la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici*) (Zhan et al. 2015), les rouilles, *Phytophthora infestans* sur pomme de terre (Pariaud et al. 2009).

L'analyse de l'impact des successions de E8 sur la structuration génétique spatiale des populations de *R.solanacearum*, est encore en cours, et l'estimation de paramètres démographiques par approche ABC est une perspective prévue.

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Jérémy Guinard, et 2 stages Master 2 (Anne Latreille, Lakshmi Sujeeun). Ils font l'objet d'une publication soumise, et une publication en préparation.

Guinard Jérémy, Latreille Anne, Guérin Fabien, Poussier Stéphane, Wicker Emmanuel.

2015. A new MLVA scheme for fine-tune monitoring and microevolution study of *Ralstonia solanacearum* phylotype I populations. Soumis à *BMC Microbiology*.

Guinard Jérémy, Sujeeun Lakshmi, Damour Anais, Chiroleu Frédéric, Poussier Stéphane, Wicker Emmanuel. Field-based experimental evolution of a natural population of *R. solanacearum* phylotype I gives new insight into its evolutionary dynamics and its dissemination pattern at the field scale. En preparation.

6 Conclusions et perspectives

Notre approche des interactions *R.solanacearum*/Solanacées s'est résolument placée dans le cadre du modèle gène-à-gène ; ceci nous a permis d'identifier un candidat sérieux d'avirulence, mais nous ouvre également un champ de questions, sans réponse pour l'instant. Pour rappel le modèle que nous avons suivi tient en une phrase : « La résistance observée chez AG-9125 (E6) est expliquée par l'interaction entre un effecteur de type III et le gène majeur de résistance *Ers1* ».

L'identification de *ripAX2* comme effecteur d'avirulence sur E6 permet d'envisager de nombreuses perspectives prometteuses en génétique fonctionnelle, moyennant un réseau de collaborations saines et équilibrées. Il peut en effet être envisagé d'analyser plus précisément sa cinétique d'expression en fonction du fond génétique de la plante, son éventuelle spécificité d'organe (via par exemple une approche GFP), la relation structure-fonction en prenant en compte les différents allèles de *ripAX2* identifiés dans nos collections. Ceci permettra d'identifier les résidus critiques pour l'avirulence sur aubergine, alors que le motif HELIH, considéré comme critique dans l'interaction avec *S. torvum* (Nahar et al. 2014), est en fait conservé chez les avirulents et virulents sur aubergine, y compris dans les souches d'infections latentes sur E6 (cf. 3.3.5.5).

Ce gène pourrait également être utilisé dans la recherche du ou des gènes interacteurs chez la plante sur les RILs E8xE6, par l'approche ETHAN (Thomas et al. 2009) présentée en 5.3.3.

RipAX2 semble être un effecteur fréquent dans les populations de *R.solanacearum*, au moins dans le phylotype I. Il reste à cerner l'implication de *ripAX2* dans la fitness bactérienne, ce qui impliquera de comparer les traits d'histoire de vie de porteurs et non porteurs de *ripAX2*.

Maintenant, de nombreuses questions demeurent.

- Tout d'abord, *ripAX2* est-il spécifiquement reconnu par E6, ou est-il aussi reconnu par E1, E2, E3, E4, E9 ? L'approche suivie en 3.3.3.3. devrait être élargie à ces cinq accessions.
- Quels sont les réels interacteurs impliqués dans la résistance d'E6 et où se situent-ils sur la carte nouvellement construite par S. SALGON (thèse en cours) ? Des tests d'expression transitoire de *ripAX2* dans les RILs E8xE6 permettraient de préciser ces points
- Une voie à explorer concerne les mécanismes de résistance de E6. L'essai pluriannuel Vallon (3.3.5.5) suggère fortement un mécanisme s'exprimant en amont de la pathogénèse ou dans les premières phases de la pathogénèse, qui induirait une forte baisse de la population bactérienne rhizosphérique. L'étude de l'effet suppressif des exsudats racinaires de E6 est une nouvelle piste fonctionnelle.
- Quels sont les effets respectifs des différents gènes présents au locus *Ers1* sur la durabilité de résistance d'E6 ? Nous avons pu montrer, contre toute attente, la durabilité de la résistance d'E6 dans des conditions pourtant très favorables au contournement (partie 3.3.5.5.). Là encore, la thèse de Sylvia SALGON devrait permettre de clarifier ce point, mais la perspective d'étude de durabilité du gène *Ers1* nécessitera de générer des lignées quasi-isogéniques (NILs) à ce locus.
- L'approche d'étude de la durabilité que nous avons choisie (évolution expérimentale au champ) doit absolument être complétée par une approche plus stringente d'inoculations sériées (serial passage experiments) proche de celle développée par A. Guidot (2014), couplée à du séquençage génomique.

L'alternative : une nouvelle approche sans a priori

Depuis le début de ce projet, nous avons phénotypé sur E6 et E8 69 souches de phylotype I, IIA, IIB, III, dont certaines sur la CORETEP2 entière. Il serait sans doute intéressant de rassembler deux pools de « virulents E6 » et « avirulents E6 » en tenant compte de la structure phylogénétique, puis reséquencer les génomes et les analyser en suivant cette fois une approche plus large, sans a priori. L'identification dans les deux pools de gènes sous sélection peut permettre d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la stratégie de virulence (Vinatzer et al. 2014), toujours obscure chez *R.solanacearum*.

Des outils disponibles pour l'épidémiosurveillance régionale et la dynamique de population sous pression de sélection

La conjonction de la MLST *egl-mutS*, de la MLSA, et des typages MLVA13, permettent d'avoir une idée plus précise de la diversité intra-phylotype épidémiologiquement active sur les différents continents. Nous avons notamment montré l'originalité des populations Africaines de phylotype I, et souligné l'importance d'approfondir leur caractérisation, particulièrement en Afrique de l'Est et Australe.

Nous avons également approché la structuration génétique de populations à l'échelle d'un pays (la côte d'Ivoire, 3.3.5.4.) et d'un champ (le Vallon, 3.3.5.5.), donnant ainsi le premier aperçu (à notre connaissance) de la dynamique spatio-temporelle d'une bactérie phytopathogène tellurique. Grâce aux marqueurs nouvellement développés il est maintenant possible de reconstruire des routes d'invasion chez *Ralstonia solanacearum*, et d'explorer plus profondément les relations entre virulence (niveau, spectre) et potentiel de dissémination.

Nos études ont été menées sur des populations « naïves », n'ayant pas été confrontées aux résistances présentes dans la CORETEP. Elles constituent donc un point de référence qui appelle au développement de suivis pluriannuels sur un réseau multilocal, englobant celles du projet RESAUBER (Cameroun, Réunion, Guyane, East-West Seeds Thaïlande, ...).

Une cartographie mondiale des virulences en construction...

Nos différents travaux ont également permis d'établir les virulences présentes en Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire, Cameroun, Bénin), Amérique du Sud (Antilles et Guyane), Océan Indien et Inde, Asie (Indonésie, Philippines, Thaïlande).

..mais pas de relation nette entre ST *egl-mutS* et les profils de virulence sur E6

Dans un même ST se côtoient des souches très agressives (phénotype 4-5) et d'autres peu agressives (phénotypes 1-2), comme dans le phylotype I/eST043-mST022 : les souches Africaines sont hautement agressives, pas celles du Vallon (La Réunion). Par ailleurs, les souches contrôlées par *ERs1* se trouvent dans plusieurs ST du phylotype I (figure 23).

| Souche | Phylotype | Clade | SEQUEVAR | eST | mST | PATHO PROFIL | VIRULENCE sur E6 (phenotype) | Contrôlé par <i>ERs1</i> |
|--------------------|-----------|-------|----------|-----|-----|--------------|------------------------------|--------------------------|
| PSS366 (RUN0155) | I | 1 | 15 | 15 | 22 | D | 1 | OUI |
| PSS358 (RUN0159) | I | 1 | 15 | 15 | 22 | D | 2 | - |
| PSS4 (RUN0157) | I | 1 | 15 | 15 | 28 | E | 5 | NON |
| CMR134 (RUN0215) | I | 1 | 13 | 19 | 30 | A | 2 | OUI |
| RUN1985 | I | 1 | 17 | 30 | 22 | - | 5 | - |
| RD1301 (RUN3013) | I | 1 | 31 | 43 | 22 | - | 1 | - |
| TD1301 (RUN3012) | I | 1 | 31 | 43 | 22 | - | 2 | - |
| TF3108 (RUN3014) | I | 1 | 31 | 43 | 22 | - | 2 | - |
| RUN1740 | I | 1 | 31 | 43 | 22 | E | 5 | - |
| RUN1743 | I | 1 | 31 | 43 | 22 | F | 5 | - |
| RUN1744 | I | 1 | 31 | 43 | 22 | F | 5 | - |
| TO10 (RUN0969) | I | 1 | 47 | 50 | 22 | - | 4 | NON |
| GMI1000 (RUN0054) | I | 1 | 18 | 60 | 22 | A | 0 | OUI |
| CMR39 (RUN0150) | IIA | 2 | 41 | 11 | 27 | C | 1 | - |
| CFBP2957 (RUN0036) | IIA | 2 | 36 | 33 | 1 | C | 2 | NON |
| CFBP6783 (RUN0017) | IIB | 4 | 4 | 16 | NA | F | 4 | - |
| CMR34 (RUN0147) | IIB | 5 | 1 | 10 | 26 | E | 5 | NON |
| CFBP3059 (RUN0039) | III | 6 | 23 | 2 | 5 | B | 4 | NON |
| CMR32 (RUN0145) | III | 6 | 29 | 9 | 25 | C | 0 | - |
| CMR15 (RUN0133) | III | 6 | 29 | 59 | 47 | E | 5 | - |

Figure 23. Caractéristiques phylogénétiques (phylotype, clade, sequevar et ST) des souches *R.solanacearum* phénotypées sur CORETEP (pathoprofil), E6, et sur les RILs E8xE6 ((Lebeau et al. 2011, Lebeau et al. 2013, N'Guessan et al. 2012, Pensec et al. 2015) et données S. SALGON 2014-2015)

Des avancées sur le potentiel évolutif, des questions sur la génétique de l'adaptation

Notre approche MLSA a permis de montrer que la recombinaison constituait l'une des forces évolutives majeures chez *Ralstonia solanacearum*. Mais cette recombinaison a été évaluée sur un nombre limité de gènes, et il reste à déterminer son importance et sa distribution à l'échelle du génome (y a-t-il des hot spots et cold spots de recombinaison ?). Les questions restées également en suspens concernent :

- l'existence de flux de gènes entre phylotypes dans une même niche écologique ? Une telle étude permettrait d'identifier les éventuelles barrières d'isolement reproductif, et clarifier la pertinence écologique des trois espèces génomiques proposées récemment (cf. 3. et 5.4.)
- le lieu privilégié des événements de recombinaison : est-ce le sol, la rhizosphère, le xylème ?

Par ailleurs, nous n'avons pas réussi à déterminer son importance réelle dans des populations d'épidémies, ainsi que sa réelle contribution dans l'adaptation à l'hôte. Il est possible que la recombinaison ne joue pas de rôle prépondérant dans le dispositif que nous avons considéré ; on ne peut toutefois exclure que les marqueurs MLVA utilisés aient été trop peu polymorphes ou inadéquats.

Toutes ces questions pourraient être clarifiées par une approche de génomique des populations, plus puissante et plus informative que la génomique comparative pratiquée jusqu'ici. A titre d'exemple, la collection Cycle 0 à cycle 4 générée durant la thèse de J. Guinard serait un excellent modèle pour identifier les régions génomiques sous sélection suite au fréquent retour de l'aubergine. De même, les collections recueillies sur zones de première culture en Guyane, sur sol en Martinique (Pirogue).

Mais tout ceci est désormais une autre histoire...

CHAPITRE 3. LE PROJET : Importance du compartiment sauvage dans l'émergence d'épidémies bactériennes- approche par la génomique des populations

La génomique des populations en phytopathologie fait l'objet d'une session spéciale du congrès annuel de l'APS (Juillet 2015), tandis qu'un atelier COST-SUSTAIN « Génomique évolutive des pathogènes de plantes » est organisé en fin Août 2015 à Kiel (<http://www.cost-sustain.org/Events-and-meetings/Workshop-Evolutionary-genomics-of-plant-pathogens#>).

L'épidémiologie moléculaire et la génétique des populations bactériennes ont considérablement progressé à partir de 1998 et le premier schéma MLST (*Neisseria meningitidis*) (Perez-Losada et al. 2013). La MLST a contribué non seulement à l'identification des souches, mais aussi à la compréhension des forces évolutives à l'œuvre dans les épidémies bactériennes. Ce sont ces études qui ont permis de poser un regard neuf sur la génétique évolutive des populations bactériennes. Essentiellement menées sur des bactéries médicales, elles ont permis de montrer que la plupart des populations connaissent de hauts niveaux de recombinaison, bien que non suffisants pour empêcher l'émergence de lignées clonales (Spratt 1999). La prépondérance de la recombinaison parmi les forces évolutives modelant les populations bactériennes peut d'ailleurs compliquer l'analyse des phylogénies moléculaires, dont il est nécessaire de distinguer la part de transmission verticale (depuis l'ancêtre commun des souches épidémiques) de celle due à la transmission horizontale.

La MLST ne cible cependant qu'un nombre limité de loci sur le génome, alors que les nouvelles technologies de séquençage offrent la possibilité d'évaluer les niveaux de recombinaison et de sélection portant sur tout le génome, y compris sur les zones non-codantes. La MLST s'est ainsi révélée insuffisamment discriminante pour étudier la dynamique évolutive des bactéries monomorphes (Achtman 2008).

1 Objectifs

Bien que le domaine soit encore relativement nouveau en épidémiologie végétale, il existe un corpus grandissant de références soulignant l'importance du compartiment non-cultivé dans

la persistance d'agents phytopathogènes et la possible émergence de nouveaux variants (Stukenbrock and McDonald 2008), comme chez *Pseudomonas syringae* (Bartoli et al. 2015, Diallo et al. 2012, Monteil et al. 2013, Vinatzer et al. 2014), ou pour le contournement de résistance de l'hôte comme dans le cas de *Venturia inaequalis* sur pommier (Leroy et al. 2014).

Les objectifs de ce projet sont donc : (i) d'identifier le compartiment non cultivé/sauvage d'une bactériose vasculaire émergente, (ii) comparer la diversité et structuration génétiques des populations du compartiment sauvage/alternatif à celles existant sur la culture hôte, tout en identifiant les spécificités de la population « sauvage » (contenu en gènes, patterns de sélection), (iii) estimer les flux géniques entre populations de ces deux compartiments, (iv) identifier les processus évolutifs (recombinaison, sélection) et démographiques qui ont permis l'émergence de cette bactériose.

2 Le modèle : les *Xanthomonas* vasculaires du bananier (*Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum*)

2.1 Le flétrissement bactérien du bananier

Xanthomonas musacearum est en fait isolé et caractérisé pour la première fois en Ethiopie, sur des plants malades d' *Ensete ventricosum*, une Musacée alimentaire très consommée et cultivée dans les régions centrales et méridionales d'Ethiopie (Yirgou and Bradbury 1968). Les symptômes décrits (flétrissement rapide de la jeune feuille centrale suivi de la mort du plant entier) font écho à une première description d'épidémie 30 ans plus tôt, dans la région du Garo (Galla et Sidama), région centrale proche d'Awassa (Castellani 1939), qui avaient été attribués à l'époque à *Pseudomonas solanacearum* mais sans isolement microbiologique. Ce dernier point laisse penser que la maladie est probablement présente dans la région depuis au moins les années 1930. Il est prouvé expérimentalement que ce pathogène peut attaquer indistinctement l'Ensete et le bananier. Plus tard, une épidémie de *X.musacearum* est décrite sur bananier en conditions naturelles, dans la province de Kaffa (région autour de Jima). Là encore les isolats identifiés attaquent bananier et Ensete, mais ne provoquent de symptômes ni sur sorgho, ni sur maïs (Yirgou and Bradbury 1974).

Tout change quand le Banana Xanthomonas Wilt (BXW) dévaste en 2001 les bananeraies de Mukono en Ouganda (Tushemereirwe et al. 2004), puis progresse dans la sous-région des Grands Lacs, puis vers le Centre et l'Ouest du continent (Tripathi et al. 2009). Son extrême sévérité, sa gamme d'hôtes (tous les types variétaux de bananier sont affectés), sa rapidité de

dissémination notamment via les insectes, suscitent une grande inquiétude chez les planteurs traditionnels comme en exploitation industrielle.

Sa symptomatologie est très proche de la maladie de Moko (*Ralstonia solanacearum* phylotype II), avec des infections d'origine aérienne et tellurique, une systémie descendante (des inflorescences mâles vers le rhizome) et ascendante (du rhizome vers le pseudotrunc et feuilles), une capacité de survie en sol nu de plusieurs semaines (Mwangi, Mwebaze, et al. 2007) ; son écologie reste cependant largement méconnue.

Plusieurs stratégies nationales de lutte intégrée ont été mises en œuvre, en se basant largement sur les mesures développées dans les années 1960-1970 sur Moko, mais ces mesures se révèlent coûteuses et peu intégrées par les planteurs (Biruma et al. 2007, Tripathi et al. 2009).

La lutte génétique par déploiement de résistances variétales semble la seule voie vraiment efficace et durable. Peu de résistances variétales ont été décrites (Biruma et al. 2007, Tripathi and Tripathi 2009), de nombreuses inconnues subsistent sur sa spécificité de types variétaux bananier (AAA, AAB, etc...), et le criblage d'accessions résistantes reste largement limité, donnant des résultats décevants (Mwangi, Bandyopadhyay, et al. 2007, Tripathi and Tripathi 2009). Mais les ressources génétiques criblées sont très incomplètes, et un travail spécifique sur ce thème constitue un enjeu stratégique pour le CIRAD. La seule voie développée pour l'instant est la transgénèse (Tripathi et al. 2010) développée sur une zone limitée, et sans aucune prise en compte de la diversité/variabilité de virulence du pathogène. La spécificité et surtout la durabilité d'une telle résistance pose donc sérieusement question. La disponibilité du génome du bananier (D'Hont et al. 2012) laisse entrevoir des perspectives prometteuses sur ce volet.

L'origine de l'épidémie reste méconnue

Les premiers cas de BXW ayant été décrits en Ethiopie depuis les années 1960, on supposait jusqu'en 2012 que son origine était strictement éthiopienne, et qu'elle avait diffusé depuis ce pays dans les pays environnants via ses vecteurs insectes dans la sous-région des Grands Lacs. Le séquençage de 13 génomes Xvm isolés de bananier et Ensete a remis en question cette idée. Deux sous-lignées ont en effet été identifiées, différant de seulement 86 SNPs parmi 272 (Wasukira et al. 2012) :

- sous-lignée I (4 génomes) : trouvée en Ethiopie (1967 et 1969), RDC (2007), Rwanda (2007)

- sous-lignée II (9 génomes) : trouvée en Ouganda, Kenya, Tanzanie (2007), Burundi (2008).

Curieusement, les souches Rwanda, Congo-Kinshasa (RDC), sont différenciées du Nord Tanzanie et Ouganda alors que les mouvements de personnes, plantes, et insectes, sont fréquents entre ces pays (Figure 25).

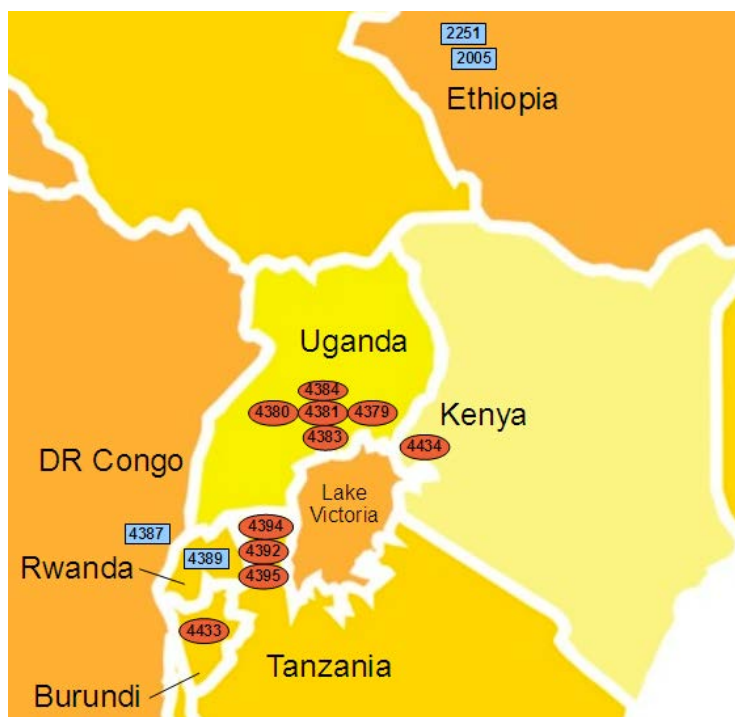


Figure 25. Sous-lignées de *X. vasicola* pv. *musacearum* identifiées par séquençage génomique. Les isolats sont identifiés par leur code NCPPB et colorés selon leur appartenance à la sous-Lignée I (pavés bleus) ou II (ellipses rouges). D'après (Wasukira et al. 2012)

Les auteurs de l'étude expliquent donc la progression du pathogène par des introductions multiples dans la région des Grands Lacs (de quelles origines ?), plutôt que par des disséminations à courte distance de proche en proche.

Cependant l'échantillonnage reste très insuffisant pour reconstituer les routes d'invasion de *Xvm*, et les auteurs n'ont pas pris en compte l'éventuelle structuration génétique par l'hôte : ces deux sous-lignées pourraient être spécialisées à un type variétal (plantain, bananier dessert, bananier à bière ?) ou à certains hôtes alternatifs.

De nombreuses questions épidémiologiques majeures demeurent donc : quelle est l'origine de la sous-lignée II ? Quelles sont les voies de dissémination respectives de ces deux sous-lignées ? Partagent-elles les mêmes hôtes alternatifs ? Ces questions ont une forte incidence sur le diagnostic de terrain, mais aussi le contrôle génétique de la maladie : quelles sont les virulences respectives des 2 sous-lignées ? Partagent-elles la même fitness ?

2.2 L'espèce *Xanthomonas vasicola*

Xanthomonas vasicola pv. *musacearum* (Aritua et al. 2008), primitivement classifiée comme *X.campestris* pv. *musacearum* (Vauterin et al. 1995), est une Gamma-Protéobactérie vasculaire, peu polymorphe (Studholme et al. 2010).

L'espèce *Xanthomonas vasicola* est membre du Groupe 2 (Young et al. 2008) qui rassemble 15 des 20 espèces de *Xanthomonas* (Parkinson et al. 2009, Rademaker et al. 2000, Rademaker et al. 2005, Young et al. 2008). Elle contient trois pathovars :

- Le pathovar *holcicola* (*Xvh*), qui rassemble des souches pathogènes du sorgho
- Le pathovar *vasculorum* (*Xvv*), qui rassemble des souches pathogènes sur canne à sucre et maïs
- Le pathovar *musacearum* (*Xvm*), pathogène du bananier et l'Ensete, mais aussi capable d'attaquer le maïs (Aritua et al. 2008).

Les génomes connus sur cette espèce (4.7 à 4.9 Mb pour *Xvm*, 4.8 à 5.4 Mb pour *Xvv*) ont livré plusieurs spécificités intéressantes. S'ils contiennent bien un système de sécrétion de type III complet et les 11 effecteurs classiques des *Xanthomonas* (*AvrBs2*, *XopA*, *XopB*, *XopG*, *XopH*, *XopI*, *XopY*, *XopAA*, *XopAD*, *XopAE*, *XopAK*), ils sont en revanche dépourvus d'effecteurs TAL, et possèdent deux effecteurs homologues de *Pseudomonas syringae* (*HopW1*, *HopAF1*) ainsi que deux cystéine-protéases homologues de *Ralstonia solanacearum*, *ripT* (RSc3212) (Studholme et al. 2010). *Xvm* se distingue particulièrement par ses gènes de biosynthèse des lipopolysaccharides, proches de ceux de *X.citri* pv. *citri*, et par le cluster de gènes codant pour les pili de type IV (*pilVWXY1E-fimT*).

Par ailleurs, une étude de phylogénomique basée sur 17 génomes de différentes espèces de *Xanthomonas* (Rodriguez et al. 2012) a identifié de nombreux flux de gènes parmi les génomes de *X.vasicola*. Cette espèce a été caractérisée par de fortes pertes ancestrales de gènes, suivies de larges gains de gènes sur les branches distales, évoquant de récents transferts horizontaux de gènes.

Les dernières données génomiques ont ensuite clairement montré que *X.v.musacearum* n'a pas pour origine *X.v.vasculorum*, ces deux pathovars faisant partie de la même lignée monophylétique (Wasukira et al. 2014). Pour autant, les contrastes sont importants. **Xvm** apparaît monomorphe, avec un taux d'identité entre génomes de 99.9985% (Wasukira et al. 2012). Les quelques polymorphismes distingués sont dus à l'acquisition par la Sous-Lignée II (responsable de l'épidémie en Ouganda et d'origine inconnue) d'un plasmide de type X20, originellement décrit chez *X.citri* pv. *malvacearum*. Les membres de la sous-lignée II auraient

par contre perdu un homologue de *XopL*, décrit chez *X.campestris* pv. *vesicatoria* comme perturbateur de l'expression des gènes associés par l'immunité-déclenchée par PAMP (PTI)(Singer et al. 2013). Par contraste, *Xvv* apparaît très variable aussi bien en SNPs qu'en contenu en gènes, notamment par l'acquisition de deux plasmides décrits respectivement chez *X.citri* pv. *citri* et *X.axonopodis* pv. *manihotis*. La capacité d'émergence de *Xvm* pourrait être due à la présence spécifique de deux orthologues de *XopJ* (effecteur de *X.campestris* pv. *vesicatoria* qui interfère avec les réponses acide-salicylique-dépendantes pour atténuer le démarrage de nécrose et altérer la transcription des gènes de l'hôte (Ustun et al. 2013, Ustun and Bornke 2015)).

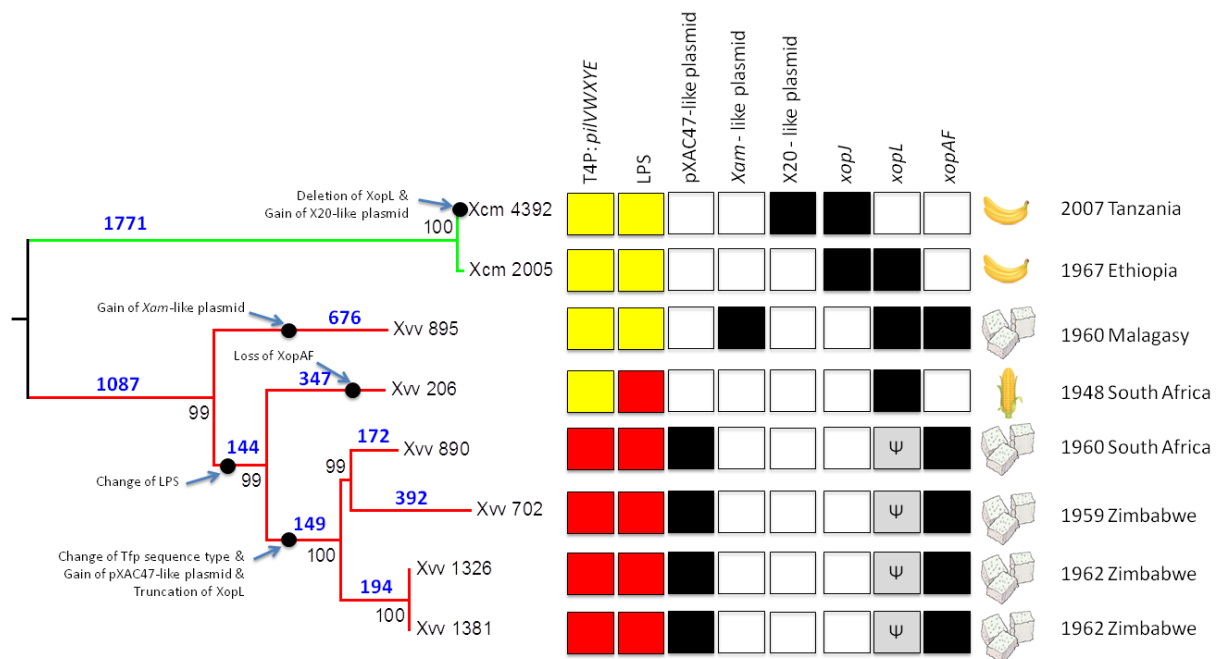


Figure 26. Synthèse des changements génétiques clé dans l'évolution de *Xvv* et *Xvm* (d'après (Wasukira et al. 2014)). Arbre phylogénétique construit par la méthode du maximum de parsimonie (MP), basé sur les 39 665 single-nucleotide variants par rapport au chromosome de XooMAFF 311018 (bootstraps calculés sur 500 répliquions). Les longueurs de branches sont calculées suivant la méthode du chemin moyen. Le nombre de différences nucléotidiques est indiqué sur les branches en bleu et gras. Les carrés indiquent la présence (noir) ou absence (blanc) des gènes. Les carrés gris marqués "Ψ" indiquent que *xopL* est interrompu par un codon stop prématuré. Les deux types de cluster « pili de type 4 » T4P *pilVWXYZ* sont colorés, respectivement, en jaune (*X.vesicatoria*-like) et rouge (*Xoo*-like). Les deux séquencotypes du cluster lipopolysaccharide (LPS) sont respectivement indiqués en jaune (*X.citri*-like) et rouge. A droite : origine de chaque souche : bananier/enset, canne à sucre, ou maïs, date et pays d'isolement.

2.3 Le pouvoir pathogène sur bananier, caractère polyphylétique chez *Xanthomonas* ?

Deux souches isolées de bananier dans les années 1950 aux îles Samoa, et une souche isolée d'insecte présent sur un bananier malade (en Tanzanie), se sont avérées appartenir à l'espèce *Xanthomonas sacchari* (Groupe 1). Ces trois souches partagent des caractères génomiques proches de *X.albilineans*, mais ne possèdent ni le système Hrp, ni le système SPI-1, ni l'opéron codant pour l'albicidine, et ne présentent pas de réduction significative de génome (Studholme et al. 2011, 2012). Ces résultats suggèrent que *Xanthomonas* aurait suivi deux stratégies pour survivre sur le bananier : l'une suivie par Xvm adapté à plusieurs environnements (sol, insectes, vaisseaux du xylème), et l'autre suivie par ces *X.sacchari* inféodés au xylème et peut-être aux insectes. L'importance épidémiologique de cette deuxième stratégie reste à démontrer, d'autant qu'aucun *X.sacchari* n'a à notre connaissance été isolé des épidémies en cours en Afrique.

2.4 Un modèle intéressant pour la génomique de l'adaptation des *Xanthomonas*

Xanthomonas vasicola semble être doté d'un potentiel adaptatif très élevé, comme l'illustre la récente description d'une épidémie de dépérissement de l'Eucalyptus en Afrique du Sud provoquée par des souches de Xvv originaires de champs de canne voisins (Coutinho et al. 2015).

Les différents génomes disponibles portent par ailleurs des signatures de nombreux transferts génétiques latéraux récents, suggérant que la recombinaison est une force évolutive prépondérante chez cette espèce. Les premières séquences génomiques de Xvm (NCPPB 4381, isolée de bananier en Ouganda, 2007) et Xvv (NCPPB 702) portent plusieurs traces de transferts génétiques horizontaux récents avec des espèces phylogénétiquement éloignées (Studholme et al. 2010). Ainsi Xvv porte plusieurs séquences plasmidiques originaires de la Gamma-Proteobactérie *Klebsiella pneumoniae* (bactérie endophyte de la canne à sucre) ainsi que de l'alpha-Proteobactérie *Methylobacter radiotolerans* (connue comme endophyte, épiphyte et symbionte) et de bactéries habitant la rhizosphère du blé et de la luzerne. Xvm semble avoir acquis des séquences de Beta-Proteobactéries, notamment *Acidovorax* sp et *X. campestris* pv. *vesicatoria*, peut-être d'origine plasmidique également.

La qualité des séquences génomiques disponibles est cependant insuffisante pour appréhender de façon pertinente les régions génomiques sujettes à la recombinaison

(nombre de contigs supérieur à 150, pas de distinction claire entre séquence chromosomique et plasmidique).

3 Le projet

3.1 Des séquences génomiques de qualité

Les séquences de Xvm actuelles, obtenues par technologie Illumina GA2, ont le défaut d'être incomplètes et fragmentées : le meilleur génome, NCPPB4381 (Studholme et al. 2010), contient 115 scaffolds. Il sera donc important en premier lieu d'obtenir des génomes de Xvm complets de haute qualité, pour s'en servir comme génomes-pivots.

Nous séquencerons par technologie PacBio au moins deux génomes de Xvm, choisis parmi les références déjà disponibles. L'un devra être isolé d'Ensete (par exemple NCPPB 2005 = CFBP7123 (Ensete, Ethiopie, 1967)) et l'autre isolé de bananier (par exemple NCPPB 2251 = CFBP7122 (Bananier, Ethiopie, 1969)). Une possibilité est de séquencer également la/les souches utilisées pour le criblage de résistance des bananiers transgéniques développés par l'IITA (Tripathi et al. 2008, Tripathi et al. 2014). Sur ce volet, l'appui du réseau français des Xanthomonas (FNX) sera le bienvenu.

3.2 Des marqueurs adaptés à l'épidémiologie moléculaire

Compte-tenu du très faible polymorphisme trouvé dans les génomes Xvm actuels, il est illusoire de vouloir développer un schéma MLST. Les marqueurs SNPs disponibles ne sont pas non plus nombreux ; 4 seulement ont été transformés en marqueurs PCR pour distinguer les deux lignées (Wasukira et al. 2012). Il sera donc nécessaire de développer d'autres marqueurs, de type MLVA. Ce développement peut commencer très rapidement grâce aux 7 génomes Xvm assemblés disponibles sur GenBank.

Compte-tenu du très faible polymorphisme des populations échantillonnées jusque-là, nous nous orienterons sur des loci à évolution rapide (5-9 nt, au moins 10 rep de motif dans le génome d'origine). La collection à utiliser pour le criblage pourra être celle présente en CFBP, ainsi que celle du FERA (contenant des isolats des épidémies de RDC de 2003 à 2008).

Ce set MLVA sera utilisé en complémentarité avec les marqueurs SNPs, pour sonder les populations échantillonnées en Ethiopie, Tanzanie, Clinique des Plantes de RDC et identifier les populations les plus intéressantes à séquencer pour générer d'autres SNPs.

3.3 Reconstituer l'origine de l'émergence de Xvm : le cas de l'Ethiopie

Le monomorphisme observé chez *X.vasicola* pv. *musacearum*, rappelant celui d'autres bactéries médicales majeures (*Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* serovar *typhi* (Achtman 2008)), se base sur des isolats exclusivement collectés sur bananier, voire d'inflorescence de bananier (donc issues d'infections aériennes transmises par insecte). Cette propriété suggère l'existence d'un goulot d'étranglement important à l'origine de l'émergence (Achtman 2008), à partir d'une population d'origine plus diversifiée et peut-être moins spécialisée. Les objectifs de cette partie seront donc d'identifier cette population d'origine (voire l'ancêtre commun), de caractériser sa spécificité génétique et génomique (contenu en gènes, structuration génétique de population, importance de la recombinaison), d'inférer et quantifier les flux de gènes de cette population « endémique » avec la population émergente, à l'échelle du génome jusqu'aux populations.

Cette étude sera donc située en Ethiopie, dans le centre d'origine et de diversité putatif de Xvm. Les régions d'Awassa (zone de première description probables dans les années 1930 (Castellani 1939)) et/ou de Jima (zone de première description en 1968 (Yirgou and Bradbury 1968)) seront ciblées, dans des zones de sévérité moyenne de Wilt de l'Ensete.

L'échantillonnage est un point-clé. Le ou les sites de prélèvements devront donc comprendre une interface bananier cultivé/ensete cultivé à symptômes /Ensete cultivé asymptomatique /compartiment naturel. Ce compartiment naturel/alternatif est encore à caractériser avec l'aide d'écologues de la région, mais il pourrait inclure, outre le sol, les musacées et Zingibéracées sauvages, le sorgho (bien que non attaqué par Xvm (Yirgou and Bradbury 1968, 1974)), *Canna orchoides* (ornementale), le gingembre. Les adventices les plus abondantes en Ethiopie sont des Asteracées, Poacées et Fabacées ; *Digitaria abyssinica* est la plus fréquente, suivie de *Parthenium hysterophorus* (Tamado and Milberg 2000).

Des campagnes d'échantillonnage à petite échelle (de la parcelle au plant) devraient nous permettre d'inférer des paramètres démographiques (taille efficace, nombre de générations/an).

Une approche sans *a priori* dans les zones non cultivées bordant les bananeraies permettrait sans doute d'identifier des plantes-réservoir jusque-là inconnues. Un volet d'échantillonnage sans isolement peut être envisagé en collaboration avec l'équipe de métagénomique de l'UMR BGPI (C. VERNIERE, P. ROUMAGNAC).

Les analyses de diversité génétique seront menées en deux temps. Le génotypage MLVA permettra de sonder les collections échantillonnées, afin d'identifier les patterns de structuration et les populations en présence.

Une approche de génomique des populations sera ensuite développée sur les populations identifiées pour :

- Inférer les flux de gènes entre populations au niveau génomique
- Identifier les hot spots et cold spots de recombinaison sur les génomes
- Identifier des SNPs spécifiques de chaque population
- Estimer la variabilité nucléotidique des gènes candidats de virulence de Xvm : XopJ, ripT, HopW1, HopAF1
 - o Un projet satellite pourrait être de caractériser la/les fonctions de ces T3Es sur bananiers, avec une collaboration AGAP/IPME/VTECH/LIPM

Les données et marqueurs générés dans cette partie alimenteront la partie 2.

3.4 Reconstruire les routes d'invasion de Xvm en Afrique

L'objectif est ici d'identifier les différentes populations présentes dans les épidémies, leurs relations épidémiologiques, et les paramètres évolutifs impliqués dans cette invasion. Ces différents paramètres permettront de reconstituer les routes d'invasion les plus probables, par méthodes inférentielles (ABC par exemple).

Echantillonnage : Outre la zone d'origine, qui fait l'objet du volet 3.3, il sera important d'échantillonner :

- Le « carrefour » soupçonné entre les deux sous-lignées identifiées par Studholme : Rwanda, ou Sud de l'Ouganda (région de Kabalé) près de la RDC et du Rwanda
- Le front d'émergence, se situant actuellement en RDC (C. Bragard, comm. personnelle), près de la Vallée du Congo. Une collaboration avec les Cliniques des Plantes des régions du Katanga, Kasaï, Bandundu, Bas-Congo, permettront d'établir un transect intéressant, tenant compte des cultivars de bananier touchés.
- Les centres régionaux de propagation de matériel en Musacées alimentaires ET ornementales
- Les régions non-échantillonnées ou sous-échantillonnées : le Kenya, et surtout la Tanzanie, origines possibles de la sous-lignée II.

Le génotypage de ces populations sera mené par MLVA, et SNPs issus de séquençages génomiques.

Conditions :

- L'Identification d'un dispositif expérimental stable en Ethiopie est un préalable. Les contacts avec l'Université d'HAWASSA vont être approfondis en ce sens.
- Les compétences en bioinformatique (outre notre collaboration avec l'Université d'Exeter) seront sollicitées auprès du « Collectif Baillarguet »(G. SEMPERE et E. LOIRE notamment), ainsi que dans le cadre du projet-Etendard EpidémioSurveillance.
- Un financement partiel des prospections est prévu dans le cadre du projet Etendard E-SPACE, les autres financements seront à mobiliser via le CPR-RTB, la Fondation Agropolis, le CASDAR,...

Partenariat identifié :

- Alemayehu CHALA, Hawassa University, Ethiopie
- Eshetu DERSO, Ethiopian Institute of Agricultural Research EIAR, Debre Zeit Research Center
- D. STUDHOLME, University of Exeter, Royaume-Uni
- J. SMITH, FERA, Royaume-Uni
- C. BRAGARD, Université de Louvain, Belgique

4 Apports du projet, perspectives/retombées attendues

Ce projet fournira des données précieuses et générera des approches d'analyse des échanges/transferts de populations pathogènes entre compartiment naturel/non-cultivé et compartiment cultivé qui pourront être transposées à d'autres modèles bactériens, comme par exemple *X.oryzae*/*X.maliensis*, ...

Ce projet développera des approches communes à l'équipe ABIP de l'UMR IPME.

Xanthomonas vasicola étant une espèce proche de *X.oryzae*, cette approche devrait bien s'insérer dans l'UMR IPME.

Ce projet permettra également d'alimenter des « pathogen-informed breeding strategies » pour le bananier et le plantain, par la description des différentes populations de Xvm, l'identification des facteurs génétiques de virulence présents dans les populations naturelles (peut-être différents des T3E identifiés jusque-là ?). L'étude des contraintes évolutives (sélection notamment) opérant sur ces facteurs de virulence, couplée à la caractérisation fonctionnelle de ceux-ci, pourra permettre d'anticiper l'éventuel contournement de résistances naturelles ou transgéniques chez le bananier.

Références bibliographiques

- Abramovitch, R. B., and Martin, G. B. 2005. AvrPtoB: a bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiology Letters* 245:1-8.
- Achtman, M. 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* 62:53-70.
- Agapow, P.-M., and Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1:101-102.
- Ailloud, F. 2015. Le pouvoir pathogène chez *Ralstonia solanacearum* phylotype II: génomique intégrative et paysages transcriptomiques en relation avec l'adaptation à l'hôte. PhD, Faculté des Sciences et Technologies, Ecole Doctorale Science Technologies et Santé, Université de La Réunion, Saint Pierre.
- Ailloud, F., Lowe, T., Cellier, G., Roche, D., Allen, C., and Prior, P. 2015. Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. *BMC Genomics* 16(1):270 doi:10.1186/s12864-015-1474-8.
- Albuquerque, G., Santos, L., Felix, K., Rollemberg, C., Silva, A., Souza, E., Cellier, G., Prior, P., and Mariano, R. 2014. Moko Disease-Causing Strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil Extend Known Diversity in Paraphyletic Phylotype II. *Phytopathology* 104(11):1175-1182.
- Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Sartorio, R. C., Binoti, D. H. B., Silva, R. R., Lau, D., and Vanetti, C. A. 2006. *Ralstonia solanacearum* on eucalyptus clonal nurseries in Brazil - *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucalipto no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31(4):357-366.
- Almeida, N. F., Yan, S. C., Cai, R. M., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X. A., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C., and Vinatzer, B. A. 2010. PAMDB, A Multilocus Sequence Typing and Analysis Database and Website for Plant-Associated Microbes. *Phytopathology* 100(3):208-215 doi:Doi 10.1094/Phyto-100-3-0208.
- Ambrose, E. 1987. Moko disease control: the Grenada experience. Pages 108-114. in: *Improving Citrus and Banana production in the Caribbean through sanitation: Seminar proceedings*. CTA, Wageningen.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailleau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S. 2006. *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-

- containing type III effectors to promote disease on several host plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(39):14620-5 doi:10.1073/pnas.0509393103.
- Ano, G., Hebert, Y., Prior, P., and Messiaen, C. M. 1991. A New Source of Resistance to Bacterial Wilt of Eggplants Obtained from a Cross - *Solanum-Aethiopicum* L X *Solanum-Melongena* L. *Agronomie* 11(7):555-560.
- Aritua, V., Parkinson, N., Thwaites, R., Heeney, J. V., Jones, D. R., Tushemereirwe, W., Crozier, J., Reeder, R., Stead, D. E., and Smith, J. 2008. Characterization of the *Xanthomonas* sp causing wilt of enset and banana and its proposed reclassification as a strain of *X-vasicola*. *Plant Pathology* 57(1):170-177 doi:DOI 10.1111/j.1365-3059.2007.01687.x.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Vallejos, C. E., Davis, M. J., and Jones, J. B. 2000. *Xv4-vrxv4*: a new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13(12):1346-55 doi:10.1094/MPMI.2000.13.12.1346.
- Bais, H. P., Prithiviraj, B., Jha, A. K., Ausubel, F. M., and Vivanco, J. M. 2005. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434(7030):217-21 doi:10.1038/nature03356.
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S. R., Jones, C. D., and Dangl, J. L. 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* 7(7):e1002132 doi:10.1371/journal.ppat.1002132.
- Barbary, A., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Castagnone-Sereno, P., and Djian-Caporalino, C. 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes Me1 and Me3. *Theor Appl Genet* 127(2):499-507 doi:10.1007/s00122-013-2235-1.
- Bartoli, C., Lamichhane, J. R., Berge, O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G. M., Vinatzer, B. A., and Morris, C. E. 2015. A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Mol Plant Pathol* 16(2):137-149 doi:10.1111/mpp.12167.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., de Wit, P., Marco, Y., and Deslandes, L. 2008. RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant cell* 20(8):2252-2264.

- Bertolla, F., Frostegard, A., Brito, B., Nesme, X., and Simonet, P. 1999. During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(5):467-472.
- Biruma, M., Pillay, M., Tripathi, L., Blomme, G., Abele, S., Mwangi, M., Bandhyopadhyay, R., Muchunguzi, P., Kassim, S., Nyine, M., Turyagyenda, L., and Eden-Green, S. J. 2007. Banana *Xanthomonas* wilt: a review of the disease, management strategies and future research directions. *African Journal of Biotechnology* 6(8):953-962.
- Bittel, P., and Robatzek, S. 2007. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 10(4):335-41 doi:10.1016/j.pbi.2007.04.021.
- Brown, D. G., Swanson, J. K., and Allen, C. 2007. Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Applied and environmental microbiology* 73(9):2777-2786.
- Brun, H., Chevre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A. L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., and Andrivon, D. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol* 185(1):285-99 doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x.
- Buddenhagen, I. W., Sequeira, L., and Kelman, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.
- Buhlmann, A., Dreo, T., Rezzonico, F., Pothier, J. F., Smits, T. H., Ravnkar, M., Frey, J. E., and Duffy, B. 2014. Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environ Microbiol* 16(7):2112-25 doi:10.1111/1462-2920.12289.
- Cai, R. M., Lewis, J., Yan, S. C., Liu, H. J., Clarke, C. R., Campanile, F., Almeida, N. F., Studholme, D. J., Lindeberg, M., Schneider, D., Zaccardelli, M., Setubal, J. C., Morales-Lizcano, N. P., Bernal, A., Coaker, G., Baker, C., Bender, C. L., Leman, S., and Vinatzer, B. A. 2011. The Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato Is Genetically Monomorphic and under Strong Selection to Evade Tomato Immunity. *Plos Pathogens* 7(8):e1002130 doi:DOI 10.1371/journal.ppat.1002130.
- Cao, B.-H., Lei, J.-J., Wang, Y., and Chen, G.-J. 2009. Inheritance and identification of SCAR marker linked to bacterial-wilt resistance in eggplant. *African Journal of Biotechnology* 8(20):5201-5207.
- Cardozo, C., Rodriguez, P., and Marin, M. 2009. Molecular characterization of the *Ralstonia solanacearum* species complex in the banana growing region of Uraba. *Agronomia Colombiana* 27(2):203-210.

- Cardozo, C., Rodriguez, P., Cotes, J. M., and Marin, M. 2010. Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en la zona bananera de Uraba (Colombia) [Genetic variability of the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) in the banana-growing region of Uraba (Colombia)]. *Revista de Biología Tropical* 58(1):31-44.
- Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., and Besse, P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. *Theor Appl Genet* 113(1):110-21 doi:10.1007/s00122-006-0277-3.
- Castellani, E. 1939. Su un marciume dell'Ensete [A rot of the Ensete]. *L'Agricoltura coloniale* 33:297-300.
- Cellier, G., Moreau, A., Chabirand, A., Hostachy, B., Ailloud, F., and Prior, P. 2015. A Duplex PCR Assay for the Detection of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II Strains in *Musa* spp. *PLOS ONE* 10(3):n.p.
- Ciampi, L., Sequeira, L., and French, E. R. 1980. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *American Journal of Potato Research* 57(8):377-386.
- Clarke, C. R., Studholme, D. J., Hayes, B., Runde, B., Weisberg, A., Cai, R. M., Wroblewski, T., Daunay, M. C., Wicker, E., Castillo, J. A., and Vinatzer, B. A. 2015. Genome-enabled phylogeographic investigation of the quarantine pathogen *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 and screening for sources of resistance against its core effectors. *Phytopathology* 105(5):597-607.
- Cohan, F. M. 2006. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biology* 361:1985-1996.
- Coletta-Filho, H. D., and Machado, M. A. 2003. Geographical Genetic Structure of *Xylella fastidiosa* from Citrus in Sao Paulo State, Brazil. *Phytopathology* 93(1):28-34 doi:10.1094/PHYTO.2003.93.1.28.
- Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* : detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2(3):113-121.
- Cook, D., and Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Pages 77-94. in: *Bacterial wilt- The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* A. C. Hayward, and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.

- Cook, D. E., Mesarich, C. H., and Thomma, B. P. 2015. Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annu Rev Phytopathol* 53:541-63 doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120114.
- Coupat-Goutaland, B., Bernillon, D., Guidot, A., Prior, P., Nesme, X., and Bertolla, F. 2011. *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. *Molecular plant-microbe interactions* 24(4):497-505.
- Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X., and Bertolla, F. 2008. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology* 66(1):14-24.
- Coutinho, T. A., van der Westhuizen, L., Roux, J., McFarlane, S. A., and Venter, S. N. 2015. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. *Plant Pathology* 64:576-581.
- D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J. M., Baurens, F. C., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengelle, J., Rodier-Goud, M., Alberti, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., McKain, M. R., Leebens-Mack, J., Burgess, D., Freeling, M., Mbeguie, A. M. D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Barbosa, J., Hribova, E., Heslop-Harrison, P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poiron, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, C., Bakry, F., Brown, S., Guignon, V., Kema, G., Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievert, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A. M., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, J. C., Quetier, F., Yahiaoui, N., and Wincker, P. 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488(7410):213-7 doi:10.1038/nature11241.
- Das, R. N., Sly, L. I., and Fegan, M. 2006. Molecular diversity of moko disease causing strains of *Ralstonia solanacearum*. Pages 75. in: The 4th International Bacterial Wilt Symposium G. S. Saddler, J. Elphinstone, and J. Smith, eds., York.
- Daunay, M. C., Laterrot, H., Scott, J. W., Hanson, P., and Wang, J.-F. 2010. Tomato resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* E.F. Smith: ancestry and peculiarities. *Tomato Genetics Cooperative Report* 60:6-40.
- Deberdt, P., Guyot, J., Coranson-Beaudu, R., Launay, J., Noreskal, M., Riviere, P., Vigné, F., Laplace, D., Lebreton, L., and Wicker, E. 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge on the "emerging ecotype". *Phytopathology* 104(6):586-596.
- Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pages 573-644. in: Plant-associated bacteria S. S. Gnanamanickam, ed. Springer, Dordrecht, the Netherlands.

- Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E., Beynon, J., Arlat, M., and Marco, Y. 1998. Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11(7):659-67 doi:10.1094/MPMI.1998.11.7.659.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D., Bittner, E., P, Beynon, J., Marco, Y., and Feng, D. 2002 Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(4):2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng Dong, X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(13):8024-8029.
- Deslandes, L., and Genin, S. 2014. Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* 20C:110-117 doi:10.1016/j.pbi.2014.05.002.
- Diallo, M. D., Monteil, C. L., Vinatzer, B. A., Clarke, C. R., Glaux, C., Guilbaud, C., Desbiez, C., and Morris, C. E. 2012. *Pseudomonas syringae* naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in nonagricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic. *ISME Journal* 6(7):1325-1335 doi:DOI 10.1038/ismej.2011.202.
- Didelot, X., and Falush, D. 2007. Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* 175(3):1251-66 doi:10.1534/genetics.106.063305.
- Digat, B. 1967. Survey of bacterial wilt of solanaceous crops in French West Indies and in French Guyana. Pages 19. INRA, Petit-Bourg, Guadeloupe (FWI).
- EPPO. 2015. Plant Quarantine data Retrieval system (PQR) - EPPO database on quarantine pests.
- Erbs, G., and Newman, M. A. 2012. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Mol Plant Pathol* 13(1):95-104 doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00730.x.
- Falush, D., and Bowden, R. 2006. Genome-wide association mapping in bacteria? *Trends in Microbiology* 14(8):353-5 doi:10.1016/j.tim.2006.06.003.

- Fargier, E., Fischer-Le Saux, M., and Manceau, C. 2011. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Systematic and Applied Microbiology* 34:156-165.
- Fegan, M., and Prior, P. 2002. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". P. Prior, C. Allen, and C. Hayward, eds. APS Press, Madison.
- Fegan, M. 2005. Bacterial wilt diseases of banana: evolution and ecology. Pages 379-386. in: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum species complex* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. APS Press, Saint Paul, MN, USA.
- Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". Pages 449-462. in: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. APS Press, Madison.
- Fegan, M., and Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of bananas. *Australasian Plant Pathology* 35(2):93-101.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., and Spratt, B. G. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 186(5):1518-30.
- Flores-Cruz, Z., and Allen, C. 2011. Necessity of *OxyR* for the Hydrogen Peroxide Stress Response and Full Virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(18):6426-6432.
- Fonseca, N., Guimaraes, L., Hermenegildo, P., Teixeira, R., Lopes, C., and Alfenas, A. 2014. Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* infecting *Eucalyptus* spp. *Forest pathology* 44(2):107-116.
- French, E. R., and Sequeira, L. 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America : a comparative study. *Phytopathology* 60(3):506-512.
- Frossard, P. 1987. Moko disease threatens the West Indies. Pages 115-120. in: *Improving Citrus and Banana production in the Caribbean through sanitation: Seminar proceedings*. CTA, Wageningen.
- Fukuoka, H., Hirai, T., Okuda, T., Shigematsu, Y., Sasao, A., Kimura, E., Hirano, T., Yano, S., Murakami, R., and Yamashita, Y. 2010. Comparison of the added value of contrast-enhanced 3D fluid-attenuated inversion recovery and magnetization-prepared rapid acquisition of gradient echo sequences in relation to conventional postcontrast T1-weighted images for the evaluation of leptomeningeal diseases at 3T. *AJNR. American journal of neuroradiology* 31(5):868-73 doi:10.3174/ajnr.A1937.
- Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A., and Dumas, B. 2007. Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Molecular Plant Pathology* 8(5):539-548.

- Gaulin, E., Madoui, M. A., Bottin, A., Jacquet, C., Mathe, C., Couloux, A., Wincker, P., and Dumas, B. 2008. Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS One* 3(3):e1723 doi:10.1371/journal.pone.0001723.
- Genin, S., and Boucher, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 42:107-134.
- Genin, S., and Denny, T. P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology* 50:67-89.
- Gonzalez, E. T., Brown, D. G., Swanson, J. K., and Allen, C. 2007. Using the *Ralstonia solanacearum* Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology* 73(12):3779-3786 doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02999-06>.
- Grau, C. R., Muehlchen, A. M., Tofte, J. E., and Smith, R. R. 1991. Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* 75:1153-1156.
- Grey, B., and Steck, T. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology* 67(9):3866-3872.
- Grimault, V., Schmidt, J., and Prior, P. 1993. Some characteristics involved in bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) resistance in tomato. in: *Bacterial wilt* G. L. H. Hartman, A.C., ed. ACIAR, Canberra.
- Grissa, I., Bouchon, P., Pourcel, C., and Vergnaud, G. 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90:660-668.
- Grunwald, N. J., and Hoheisel, G. A. 2006. Hierarchical Analysis of Diversity, Selfing, and Genetic Differentiation in Populations of the Oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 96(10):1134-41 doi:10.1094/PHYTO-96-1134.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., and Boucher, C. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology* 189(2):377-387.
- Guidot, A., Elbaz, M., Carrère, S., Siri, M. I., Pianzzola, M. J., Prior, P., and Boucher, C. 2009. Specific Genes from the Potato Brown Rot Strains of *Ralstonia solanacearum* and Their Potential Use for Strain Detection. *Phytopathology* 99(9):1105-1112.
- Guidot, A., Jiang, W., Ferdy, J. B., Thebaud, C., Barberis, P., Gouzy, J., and Genin, S. 2014. Multihost Experimental Evolution of the Pathogen *Ralstonia solanacearum* Unveils Genes Involved in Adaptation to Plants. *Mol Biol Evol* doi:10.1093/molbev/msu229.

- Guinard, J., Latreille, A., Guérin, F., Poussier, S., and Wicker, E. 2015. A new MLVA scheme for fine-tune monitoring and microevolution study of *Ralstonia solanacearum* phylotype I populations. BMC Microbiology soumis.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., and Poussier, S. 2009. A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. PLoS One 4(8):e6632 doi:10.1371/journal.pone.0006632.
- Hanson, P. M., Licardo, O., Hanudin, S., Wang, J.-F., and Chen, J.-T. 1998. Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. Plant Disease 82(1):74-78.
- Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27:265-277.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29:65-87.
- Hayward, A. C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 9-24. in: Bacterial wilt - The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* A. C. H. Hayward, G.L., ed. CAB International, Wallingford.
- Holub, E. B., Grau, C. R., and Parke, J. L. 1991. Evaluation of the *forma specialis* concept in *Aphanomyces euteiches*. Mycological Research 95:147-157.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Mol Ecol Resour 9(5):1322-32 doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x.
- Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A., and Moury, B. 2009. Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. Molecular Plant Pathology 10(5):599-610 doi:Doi 10.1111/J.1364-3703.2009.00554.X.
- Jaunet, T. X., and Wang, J.-F. 1999. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. Phytopathology 89(4):320-327.
- Johnson, R. 1984. A Critical Analysis of Durable Resistance. Annual Review of Phytopathology 22:309-330.
- Johnson, R. 1993. Durability of Disease Resistance in Crops - Some Closing Remarks About the Topic and the Symposium. Pages 283-300. in: Durability of Disease Resistance T. Jacobs, and J. E. Parlevliet, eds. Kluwer, Dordrecht.
- Jombart, T., Devillard, S., Dufour, A. B., and Pontier, D. 2008. Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. Heredity (Edinb) 101(1):92-103 doi:10.1038/hdy.2008.34.

- Jombart, T., Devillard, S., and Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet* 11:94 doi:10.1186/1471-2156-11-94.
- Jones, F. R., and Drechsler, C. 1925. Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches*. *Journal of Agricultural Research* 30(4):293-325.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-9 doi:10.1038/nature05286.
- Kim, N. H., Choi, H. W., and Hwang, B. K. 2010. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector AvrBsT induces cell death in pepper, but suppresses defense responses in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 23(8):1069-82 doi:10.1094/MPMI-23-8-1069.
- Kirzinger, M. W., and Stavrinides, J. 2012. Host specificity determinants as a genetic continuum. *Trends in Microbiology* 20(2):88-93 doi:10.1016/j.tim.2011.11.006.
- Labrousse, F. 1933. Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'Entomologie agricole* 19:71-84.
- Lafortune, D., Beramis, M., Daubeze, A., Boissot, N., and Palloix, A. 2005. Partial resistance of pepper to bacterial wilt is oligogenic and stable under tropical conditions. *Plant Disease* 89(5):501-506.
- Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Tremousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levailant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., Raffaele, S., Berthome, R., Coute, Y., Parker, J. E., and Deslandes, L. 2015. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* 161(5):1074-88 doi:10.1016/j.cell.2015.04.025.
- Lebeau, A. 2010. Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum* : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine. PhD, Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, Saint Denis de la Réunion.
- Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E., and Prior, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101(1):154-165.
- Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M., Wicker, E., Chiroleu, F., Prior, P., Frary, A., and Dintinger, J. 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics* 126(1):143-158.

- Leduc, A., Traore, Y. N., Boyer, K., Magne, M., Grygiel, P., Juhasz, C. C., Boyer, C., Guerin, F., Wonni, I., Ouedraogo, L., Verniere, C., Ravigne, V., and Pruvost, O. 2015. Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso. *Environ Microbiol* doi:10.1111/1462-2920.12876.
- Lefeuvre, P., Cellier, G., Remenant, B., Chiroleu, F., and Prior, P. 2013. Constraints on genome dynamics revealed from gene distribution among the *Ralstonia solanacearum* species. *PLoS One* 8(5):e63155 doi:10.1371/journal.pone.0063155.
- Leroy, T., Le Cam, B., and Lemaire, C. 2014. When virulence originates from non-agricultural hosts: new insights into plant breeding. *Infect Genet Evol* 27:521-9 doi:10.1016/j.meegid.2013.12.022.
- Lopes, C. A., Carvalho, S. I. C., and Boiteux, L. S. 2006. Prevalence of biovar 3 on bell peppers in Brazil and identification of biovar-specific response to *Ralstonia solanacearum* in *Capsicum* germplasm. Pages 88. in: The 4th International Bacterial Wilt Symposium G. S. Saddler, J. Elphinstone, and J. Smith, eds. SASA, CSL, BSPP, York, UK.
- Macho, A. P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzcon, C. R., and Genin, S. 2010. A Competitive Index Assay Identifies Several *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Mutant Strains with Reduced Fitness in Host Plants. *Molecular plant-microbe interactions* 23(9):1197-1205.
- Mahbou Somo Toukam, G., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., and Prior, P. 2009. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. *Plant disease* 93(11):1123-1130.
- Malvick, D. K., Grau, C. R., and Percich, J. A. 1998. Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity test and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycological Research* 102(4):465-475.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., and Foster, G. D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13(6):614-629.
- Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., and Lefeuvre, P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26(19):2462-2463.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M., and Spratt, B. G. 1993. How clonal are bacteria ? *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 90:4384-4388.

- McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40:349-79
doi:10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443.
- Mhedbi-Hajri, N., Darrasse, A., Pigne, S., Durand, K., Fouteau, S., Barbe, V., Manceau, C., Lemaire, C., and Jacques, M. A. 2011. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evolutionary Biology* 11 doi:Doi 10.1186/1471-2148-11-67.
- Milgroom, M. G., and Peever, T. L. 2003. Population biology of plant pathogens - The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease* 87(6):608-617.
- Milling, A., Meng, F. H., Denny, T. P., and Allen, C. 2009. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology* 99(10):1127-1134.
- Monteil, C. L., Cai, R., Liu, H., Mechan Llontop, M. E., Leman, S., Studholme, D. J., Morris, C. E., and Vinatzer, B. A. 2013. Nonagricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytologist* 199:800-811
doi:10.1111/nph.12316.
- Morse, S. M. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases* 1:7-15.
- Munkvold, G. P., Cralton, W. M., Brummer, E. C., Meyer, J. R., Undersander, D. J., and Grau, C. R. 2001. Virulence of *Aphanomyces euteiches* isolates from Iowa and Wisconsin and benefits of resistance to *A.euteiches* in alfalfa cultivars. *Plant Disease* 85(3):328-333.
- Mwangi, M., Bandyopadhyay, R., Ragama, P., and Tushemereirwe, W. K. 2007. Assessment of banana planting practices and cultivar tolerance in relation to management of soilborne *Xanthomonas campestris* pv *musacearum*. *Crop Protection* 26(8):1203-1208 doi:DOI 10.1016/j.cropro.2006.10.017.
- Mwangi, M., Mwebaze, M., Bandyopadhyay, R., Aritua, V., Eden-Green, S., Tushemereirwe, W., and Smith, J. 2007. Development of a semiselective medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from insect vectors, infected plant material and soil. *Plant Pathology* 56(3):383-390 doi:DOI 10.1111/j.1365-3059.2007.01564.x.
- N'Guessan, A. C. 2013. Phylogénie, structure génétique et diversité de virulence de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien, en Côte d'Ivoire. PhD, UFR BioSciences, Université de Cocody-Abidjan, Abidjan.
- N'Guessan, A. C., Pensec, F., Lemaire, C., Lefeuvre, P., and Wicker, E. 2014. Molecular epidemiology and virulence typing of *Ralstonia solanacearum* raise new prospects for

- sustainable control of Solanaceae bacterial wilt. in: The 13th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria G. Y. Chen, ed. ICPPB, Shanghai, China.
- N'Guessan, C. A., Abo, K., Fondio, L., Chiroleu, F., Lebeau, A., Poussier, S., Wicker, E., and Kone, D. 2012. So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Cote d'Ivoire in Africa. *Phytopathology* 102(8):733-740.
- N'Guessan, C. A., Brisse, S., Le Roux-Nio, A.-C., Poussier, S., Koné, D., and Wicker, E. 2013. Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of Microbiological Methods* 92(1):366-374.
- Nahar, K., Matsumoto, I., Taguchi, F., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y., and Mukaiharu, T. 2014. *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*. *Molecular Plant Pathology* 15(3):297-303.
- Nakamura, Y., Ohtoh, T., Matsuda, H., and Gojobori, T. 2004. Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genetics* 36:760-766.
- Neretti, E. 2008. Etude de la structuration des populations de *Ralstonia solanacearum* en Martinique par le phylotype et la géographie. Master 2 Professionnel "Gestion de la Qualité des Productions Végétales", Université d'Avignon, Avignon.
- Norman, D., Zapata, M., Gabriel, D. W., Duan, Y. P., Yuen, J. M. F., Mangravita-Novo, A., and Donahoo, R. S. 2009. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology* 99(9):1070-1077 doi:10.1094/PHYTO-99-9-1070.
- Nunome, T., Yoshida, T., and Hirai, M. 1998. Genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena* L.). Pages 239-242. in: Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant A. Palloix, and M.-C. Daunay, eds. INRA Editions, Paris.
- Nunome, T., Negoro, S., Kono, I., Kanamori, H., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Ohyama, A., and Fukuoka, H. 2009. Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 119(6):1143-1153 doi:DOI 10.1007/s00122-009-1116-0.
- Ottmann, C., Luberacki, B., Kufner, I., Koch, W., Brunner, F., Weyand, M., Mattinen, L., Pirhonen, M., Anderluh, G., Seitz, H. U., Nurnberger, T., and Oecking, C. 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(25):10359-64 doi:10.1073/pnas.0902362106.
- Palloix, A., Ayme, V., and Moury, B. 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and

- consequences for breeding strategies. *New Phytol* 183(1):190-9 doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02827.x.
- Pariaud, B., Ravigne, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58(3):409-424 doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., and Stead, D. 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 2):264-74 doi:10.1099/ijs.0.65825-0.
- Peeters, N., Carrere, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazale, A. C., and Genin, S. 2013. Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics* 14(859):n.p.
- Pensec, F., Lebeau, A., Daunay, M. C., Chiroleu, F., Guidot, A., and Wicker, E. 2015. Towards the identification of Type III effectors associated to *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant. *Phytopathology Online First*.
- Perez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., and Crandall, K. A. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol* 16:38-53 doi:10.1016/j.meegid.2013.01.009.
- Pilet-Nayel, M.-L., Kraft, J. M., McGee, R. J., Muehlbauer, F. J., Baranger, A., and Coyne, C. J. 2001. Quantitative Trait Loci mapping for *Aphanomyces* root rot resistance in pea. in: 4th European Conference on Grain Legumes - Towards the sustainable production of healthy food, feed and novel products 4th European Conference on Grain Legumes AEP, ed., Cracow, Poland.
- Pilet-Nayel, M.-L., Muehlbauer, F. J., McGee, R. J., Kraft, J. M., Baranger, A., and Coyne, C. J. 2005. Consistent Quantitative Trait Loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology* 95(11):1287-1293.
- Pilet-Nayel, M.-L., Coyne, C. J., Hamon, C., Lesné, A., Le Goff, I., Esnault, R., Lecointe, R., Roux-Duparque, M., McGee, R., Mangin, P., McPhee, K., Moussart, A., and Baranger, A. 2007. Understanding genetics of partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea for new breeding prospects. Pages 34-39. in: Third *Aphanomyces* Workshop on Legumes M.-L. Pilet-Nayel, A. Moussart, A. Allée, and A. Baranger, eds. AEP/UNIP, Le Rheu, France.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A. C., Boucher, C., and Genin, S. 2009. Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Molecular plant-microbe interactions* 22(5):538-50 doi:10.1094/MPMI-22-5-0538.

- Poueymiro, M., and Genin, S. 2009. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology* 12(1):44-52.
- Poussier, S. 2000. Exploration de la diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs d'inoculum. PhD thesis, Ecole Doctorale Vie-Agronomie-Santé, Rennes I, Rennes.
- Prior, P., and Steva, H. 1990. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. *Plant Disease* 74(1):13-17.
- Prior, P., Steva, H., and Cadet, P. 1990. Aggressiveness of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadeloupe) on tomato. *Plant Disease* 74(12):962-965.
- Prior, P., and Fegan, M. 2002. Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains. P. Prior, C. Allen, and C. Hayward, eds. APS Press, Madison.
- Prior, P., and Fegan, M. 2005. Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains by multiplex PCR. Pages 405-414. in: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. APS Press, Madison.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945-59.
- Quenouille, J., Paulhiac, E., Moury, B., and Palloix, A. 2014. Quantitative trait loci from the host genetic background modulate the durability of a resistance gene: a rational basis for sustainable resistance breeding in plants. *Heredity* 112(6):579-87
doi:10.1038/hdy.2013.138.
- Rademaker, J. L., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., and de Bruijn, F. J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 2:665-77.
- Rademaker, J. L., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and de Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *xanthomonas*. *Phytopathology* 95(9):1098-111 doi:10.1094/PHYTO-95-1098.
- Ramsubhag, A., Lawrence, D., Cassie, D., Fraser, R., Umaharan, P., Prior, P., and Wicker, E. 2012. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. *Plant pathology* 61(5):844-857.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., and Prior, P. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the

- Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. BMC Genomics 11(379):1-16.
- Remenant, B., de Cambiaire, J. C., Cellier, G., Jacobs, J. M., Mangenot, S., Barbe, V., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., Fegan, M., Allen, C., and Prior, P. 2011. *Ralstonia syzygii*, the Blood Disease Bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. PLoS One 6(9):e24356 doi:10.1371/journal.pone.0024356.
- Remenant, B., Babujee, L., Lajus, A., Medigue, C., Prior, P., and Allen, C. 2012. Sequencing of K60, Type Strain of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. Journal of Bacteriology 194(10):2742-2743.
- Remigi, P., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S., and Peeters, N. 2011. Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. The New phytologist 192(4):976-87 doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03854.x.
- Rodriguez, R. L., Grajales, A., Arrieta-Ortiz, M. L., Salazar, C., Restrepo, S., and Bernal, A. 2012. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. BMC Microbiol 12:43 doi:10.1186/1471-2180-12-43.
- Rorer, J. B. 1911. A bacterial disease of bananas and plantains. Phytopathology 1:27-52.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., and Kappler, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 64(9):3087-3103.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choise, N., Claudel Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., and Levy, M. e. a. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature (London) 415(6871):497-502.
- Sambasivam, P. K., and Girija, D. 2007. Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* infecting ginger in Kerala. Journal of Ecobiology 20(3):229-237.

- Sanchez Perez, A., Mejia, L., Fegan, M., and Allen, C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant pathology* 57(2):320-331.
- Sarkar, S. F., and Guttman, D. S. 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1999-2012.
- Sarris, P. F., Duxbury, Z., Huh, S. U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S. B., Wirthmueller, L., Menke, F. L., Sohn, K. H., and Jones, J. D. 2015. A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. *Cell* 161(5):1089-100 doi:10.1016/j.cell.2015.04.024.
- Sequeira, L., and Averre, C. W. 1961. Distribution and pathogenicity of strains of *Pseudomonas solanacearum* from virgin soils in Costa Rica. *Plant Disease Reporter* 45(6):435-440.
- Sequeira, L. 1998. Bacterial wilt: the missing element in International banana improvement programs. Pages 6-14. in: *Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects* P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. Springer - INRA Editions, Heidelberg, Paris.
- Silveira, E. B., Gomes, A. M. A., Michereff, S. J., and Mariano, R. L. R. 1998. Variability of *Ralstonia solanacearum* populations causing wilt on tomato in Agreste of Pernambuco, Brazil. *Bacterial Wilt Newsletter* 15:8-10.
- Singer, A. U., Schulze, S., Skarina, T., Xu, X., Cui, H., Eschen-Lippold, L., Egler, M., Srikumar, T., Raught, B., Lee, J., Scheel, D., Savchenko, A., and Bonas, U. 2013. A pathogen type III effector with a novel E3 ubiquitin ligase architecture. *PLoS Pathog* 9(1):e1003121 doi:10.1371/journal.ppat.1003121.
- Siri, M. I., Sanabria, A., and Pianzola, M. J. 2011. Genetic Diversity and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Strains Causing Bacterial Wilt of Potato in Uruguay. *Plant disease* 95(10):1292-1301.
- Smith, E. F. 1896. A bacterial disease of tomato, eggplant, and Irish potato (*Bacterium solanacearum* nov. sp.). *USDA Div. Veg. Physiol. Pathol. Bull.* 12:191.
- Sole, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K., Jones, J. D. G., Deslandes, L., and Valls, M. 2012. The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Molecular plant-microbe interactions* 25(7):941-953.
- Solé, M., Ehonen, S., Deslandes, L., Genin, S., and Valls, M. 2010. AWR gene family from *Ralstonia solanacearum* is involved in plant cell-death. Pages 56. in: *9èmes rencontres Plantes-Bactéries d'Aussois* V. Verdier, ed. SFP-CIRAD-INRA-IRD, Aussois, France.

- Spratt, B. G. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 2(3):312-6 doi:10.1016/S1369-5274(99)80054-X.
- Spratt, B. G., Hanage, W. P., Li, B., Aanensen, D. M., and Feil, E. J. 2004. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiology Letters* 241(2):129-34 doi:10.1016/j.femsle.2004.11.015.
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A. J., Morris, J. A., Boevink, P. C., Hedley, P. E., and Huitema, E. 2013. Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PLoS One* 8(3):e59517 doi:10.1371/journal.pone.0059517.
- Stavrínides, J. 2009. Origin and evolution of phytopathogenic bacteria. Pages 1-36. in: *Plant pathogenic bacteria - genomics and molecular biology* R. W. Jackson, ed. Caister Academic Press, Reading, UK.
- Studholme, D. J., Kemen, E., MacLean, D., Schornack, S., Aritua, V., Thwaites, R., Grant, M., Smith, J., and Jones, J. D. 2010. Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. *FEMS microbiology letters* 310(2):182-92 doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02065.x.
- Studholme, D. J., Wasukira, A., Paszkiewicz, K., Aritua, V., Thwaites, R., Smith, J., and Grant, M. 2011. Draft Genome Sequences of *Xanthomonas sacchari* and Two Banana-Associated *Xanthomonads* Reveal Insights into the *Xanthomonas* Group 1 Clade. *Genes (Basel)* 2(4):1050-65 doi:10.3390/genes2041050.
- Studholme, D. J., Wasukira, A., Paszkiewicz, K., Aritua, V., Thwaites, R., Smith, J., and Grant, M. 2012. Draft Genome Sequences of *Xanthomonas sacchari* and Two Banana-Associated *Xanthomonads* Reveal Insights into the *Xanthomonas* Group 1 clade (vol 2, pg 1050, 2011). *Genes* 3(1):88-89 doi:DOI 10.3390/genes3010088.
- Stukenbrock, E. H., and McDonald, B. A. 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu Rev Phytopathol* 46:75-100 doi:10.1146/annurev.phyto.010708.154114.
- Tamado, T., and Milberg, P. 2000. Weed flora in arable fields of eastern Ethiopia with emphasis on the occurrence of *Parthenium hysterophorus*. *Weed Research* 40(6):507-521 doi:DOI 10.1046/j.1365-3180.2000.00208.x.
- Terauchi, R., and Yoshida, K. 2010. Towards population genomics of effector-effector target interactions. *New Phytologist* 187(4):929-39 doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03408.x.
- Thomas, W. J., Thireault, C. A., Kimbrel, J. A., and Chang, J. H. 2009. Recombineering and stable integration of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp/hrc cluster into the

- genome of the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Plant J* 60(5):919-28 doi:10.1111/j.1365-3113X.2009.03998.x.
- Thwaites, R., Eden-Green, S., and Black, R. 2000. Diseases caused by bacteria. Pages 213-239. in: *Diseases of banana, abaca and enset* D. R. Jones, ed. CAB International, Wallingford.
- Timilsina, S., Jibrin, M. O., Potnis, N., Minsavage, G. V., Kebede, M., Schwartz, A., Bart, R., Staskawicz, B., Boyer, C., Vallad, G. E., Pruvost, O., Jones, J. B., and Goss, E. M. 2015. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Appl Environ Microbiol* 81(4):1520-1529 doi:10.1128/AEM.03000-14.
- Tripathi, L., Odipio, J., Tripathi, J. N., and Tusiime, G. 2008. A rapid technique for screening banana cultivars for resistance to *Xanthomonas* wilt. *European Journal of Plant Pathology* 121(1):9-19 doi:DOI 10.1007/s10658-007-9235-4.
- Tripathi, L., Mwangi, M., Abele, S., Aritua, V., Tushemereirwe, W. K., and Bandyopadhyay, R. 2009. *Xanthomonas* Wilt A Threat to Banana Production in East and Central Africa. *Plant Disease* 93(5):440-451 doi:Doi 10.1094/Pdis-93-5-0440.
- Tripathi, L., and Tripathi, J. N. 2009. Relative susceptibility of banana cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *African Journal of Biotechnology* 8(20):5343-5350.
- Tripathi, L., Mwaka, H., Tripathi, J. N., and Tushemereirwe, W. K. 2010. Expression of sweet pepper Hrap gene in banana enhances resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Molecular plant pathology* 11(6):721-31 doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00639.x.
- Tripathi, L., Tripathi, J. N., Kiggundu, A., Korie, S., Shotkoski, F., and Tushemereirwe, W. K. 2014. Field trial of *Xanthomonas* wilt disease-resistant bananas in East Africa. *Nat Biotechnol* 32(9):868-70 doi:10.1038/nbt.3007.
- Turner, M., Jauneau, A., Genin, S., Tavella, M. J., Vaillau, F., Gentzbittel, L., and Jardinaud, M. F. 2009. Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development. *Plant Physiology* 150(4):1713-1722.
- Tushemereirwe, W., Kangire, A., Ssekiwoko, F., Offord, L. C., Crozier, J., Boa, E., Rutherford, M., and Smith, J. J. 2004. First report of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* on banana in Uganda. *Plant Pathology* 53(6):802-802 doi:DOI 10.1111/j.1365-3059.2004.01090.x.

- Ustun, S., Bartetzko, V., and Bornke, F. 2013. The *Xanthomonas campestris* type III effector XopJ targets the host cell proteasome to suppress salicylic-acid mediated plant defence. PLoS Pathogens 9(6):e1003427 doi:10.1371/journal.ppat.1003427.
- Ustun, S., and Bornke, F. 2015. The *Xanthomonas campestris* Type III Effector XopJ Proteolytically Degrades Proteasome Subunit RPT6. Plant Physiol 168(1):107-19 doi:10.1104/pp.15.00132.
- Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., Le Fevre, F., Longin, C., Mornico, D., Roche, D., Rouy, Z., Salvignol, G., Scarpelli, C., Thil Smith, A. A., Weiman, M., and Medigue, C. 2013. MicroScope--an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. Nucleic Acids Res 41(Database issue):D636-47 doi:10.1093/nar/gks1194.
- van den Bosch, F., and Gilligan, C. A. 2003. Mesures of durability of resistance. Phytopathology 93(5):616-625.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45(3):472-489.
- Verniere, C., Bui Thi Ngoc, L., Jarne, P., Ravigne, V., Guerin, F., Gagnevin, L., Le Mai, N., Chau, N. M., and Pruvost, O. 2014. Highly polymorphic markers reveal the establishment of an invasive lineage of the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* in its area of origin. Environ Microbiol 16(7):2226-37 doi:10.1111/1462-2920.12369.
- Vinatzer, B. A., Monteil, C. L., and Clarke, C. R. 2014. Harnessing population genomics to understand how bacterial pathogens emerge, adapt to crop hosts, and disseminate. Annu Rev Phytopathol 52:19-43 doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045907.
- Vleeshouwers, V. G., and Oliver, R. P. 2014. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. Mol Plant Microbe Interact 27(3):196-206 doi:10.1094/MPMI-10-13-0313-IA.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.-K., Wang, M., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Govers, F., Kamoun, S., and Van der Vossen, E. A. G. 2008. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. PLOS One 3(8):e2875.
- Vos, M., and Didelot, X. 2009. A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. ISME J 3(2):199-208 doi:10.1038/ismej.2008.93.
- Wang, J.-F., Hanson, P., and Barnes, J. A. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistant sources to bacterial wilt in tomato. Pages 269-275. in: Bacterial wilt disease

- Molecular and ecological aspects P. Prior, C. Allen, and J. G. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin.
- Wang, J., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N. 2000. Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13(1):6-13.
- Wang, J. F., Ho, F. I., Truong, H. T. H., Huang, S. M., Balatero, C. H., Dittapongpitch, V., and Hidayati, N. 2013. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190(2):241-252 doi:10.1007/s10681-012-0830-x.
- Wasukira, A., Tayebwa, J., Thwaites, R., Paszkiewicz, K., Aritua, V., Kubiriba, J., Smith, J., Grant, M., and Studholme, D. J. 2012. Genome-wide sequencing reveals two major sub-lineages in the genetically monomorphic pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *musacearum*. *Genes* 3:361-377.
- Wasukira, A., Coulter, M., Al-Sowayeh, N., Thwaites, R., Paszkiewicz, K., Kubiriba, J., Smith, J., Grant, M., and Studholme, D. J. 2014. Genome Sequencing of *Xanthomonas vasicola* Pathovar *vasculorum* Reveals Variation in Plasmids and Genes Encoding Lipopolysaccharide Synthesis, Type-IV Pilus and Type-III Secretion Effectors. *Pathogens* 3(1):211-37 doi:10.3390/pathogens3010211.
- Watt, S. A., Tellstrom, V., Patschkowski, T., and Niehaus, K. 2006. Identification of the bacterial superoxide dismutase (SodM) as plant-inducible elicitor of an oxidative burst reaction in tobacco cell suspension cultures. *J Biotechnol* 126(1):78-86 doi:10.1016/j.jbiotec.2006.02.022.
- Wicker, E., Grassart, L., Mian, D., Coranson Beaudu, R., Dufeal, D., Guilbaud, C., and Prior, P. 2002. *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp, new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Bacterial Wilt Newsletter* 17:20-21.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., and Prior, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73(21):6790-6801.
- Wicker, E., Coranson-Beaudu, R., Cadasse, S., and William, M. A. 2009. Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in the French West Indies raise new challenges to tomato breeders. *Acta Horticulturae* 808:279-286.

- Wicker, E., Lefeuvre, P., Cambiaire, J. C. d., Lemaire, C., Poussier, S., and Prior, P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME Journal* 6(5):961-974.
- Willoquet, L., Jumel, S., and Lemarchand, E. 2007. Spatio-temporal development of pea root rot disease through secondary infections during a crop cycle. *Journal of Phytopathology* 155:623-632.
- Woolhouse, M. E., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., and Levin, B. R. 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet* 32(4):569-77 doi:10.1038/ng1202-569.
- Woolhouse, M. E. J., Taylor, L. H., and Haydon, D. T. 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* 292(5519):1109-1112 doi:DOI 10.1126/science.1059026.
- Xu, J., Pan, Z., Prior, P., Xu, J., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, L., He, L., and Feng, J. 2009. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European journal of plant pathology* 125(4):641-653.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology* 36(12):1251-75.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and immunology* 39(11):897-904.
- Yao, J., and Allen, C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 188(10):3697-3708.
- Yao, J., and Allen, C. 2007. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of Bacteriology* 189(17):6415-6424.
- Yirgou, D., and Bradbury, J. F. 1968. Bacterial wilt of enset (*Ensete ventricosum*) incited by *Xanthomonas musacearum* sp. nov. *Phytopathology* 58:111-112.
- Yirgou, D., and Bradbury, J. F. 1974. A note on wilt of banana caused by the enset wilt organism *Xanthomonas musacearum*. *East African Agriculture and Forestry Journal* 40:111-114.

- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., and Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* 31(5):366-77 doi:10.1016/j.syapm.2008.06.004.
- Yu, Q., Alvarez, A. M., Moore, P. H., Zee, F., Kim, M. S., de Silva, A., Hepperly, P. R., and Ming, R. 2003. Molecular Diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. *Phytopathology* 93(9):1124-1130.
- Zhan, J., and McDonald, B. A. 2013. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annu Rev Phytopathol* 51:131-53 doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102302.
- Zhan, J., Thrall, P. H., Papaix, J., Xie, L., and Burdon, J. J. 2015. Playing on a Pathogen's Weakness: Using Evolution to Guide Sustainable Plant Disease Control Strategies. *Annu Rev Phytopathol* 53:19-43 doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120040.